Charakterisierung immunologisch wirksamer Proteine und Peptide des Maul- und Klauenseuche - Virus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt
von
Reinhard Franze
aus Dickersbronn

1982

Charakterisierung immunologisch wirksamer Proteine und Peptide des Maul- und Klauenseuche - Virus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt
von
Reinhard Franze
aus Dickersbronn

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung 1. April 1982

Dekan:	Prof. Dr. H.-U. Schnitzler
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Braun
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. W. Bessler

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, in der Zeit vom 1.10.1978 bis 31.7.1981 unter Anleitung von Herrn Dr. K. Strohmaier durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas und die Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit danke ich Herrn Dr. K. Strohmaier.
Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.
Mein besonderer Dank gilt Herrn K.-H. Adam für die ausgezeichnete technische Hilfe, sowie den Herren W. Schmidt, H. Lack und R. Thomma für die Produktion und Reinigung des Virus.

Für die Überlassung der Lysate aus transformierten E.coli-Plasmid-Rekombinanten danke ich Herrn Prof. Dr. P.H. Hofschneider.

Herrn Prof. Dr. V. Braun und Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Bessler danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Die photographischen Arbeiten wurden von Herrn P. Schröter, die graphischen von Herrn R. Straub durchgeführt.

Diese Arbeit wurde durch Zuwendungen vom Bundesminister für Forschung und Technologie, Bonn, unterstützt.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
Das Maul- und Klauenseuche-Virus	1
1. Morphologie	1
2. Krankheitsbild und Verbreitung der MKS	2
3. Impfprophylaxe gegen die MKS	2
B. Erkenntnisstand und eigene Fragestellung	4
C. Material und Methoden	6
1. Virus	6
2. Versuchstiere	6
2.1. Mäuse	6
2.2. Meerschweinchen	6
3. Lösungen und Kulturmedien	6
3.1. Lösungen und Medien für die Züchtung und Reinigung des Virus	6
3.2. Medien für den Plaque- und Neutralisationstest	7
3.3. Lösungen für die enzymatische Verdauung des MKSV	8
3.4. Lösungen für den ELISA	8
3.5. Sonstige Lösungen	9
4. Reagenzien	9
5. Enzyme	10
6. Geräte	11
7. Virusgewinnung	11
7.1. BHK 21 - Zellinie	11
7.2. Vermehrung der BHK 21 - Zellen	11
7.3. Virusproduktion	12
7.4. Konzentrierung und Reinigung des MKSV	12
7.5. Virusaufbewahrung	14
7.6. Virustitration	14
8. Darstellung viraler Proteine und Peptide des MKSV	14
8.1. Gewinnung der Strukturproteine	14

Seite

8.2. Darstellung chemisch gespaltener Peptide des VP_{Thr} 15
8.2.1. Die Bromcyanspaltung 15
8.2.2. Gelchromatographische Auftrennung und Reinigung der VP_{Thr}-CNBr-Peptide 16
8.3. Enzymatische Spaltung des MKSV 16
8.3.1. Trypsinspaltung und säulenchromatographische Trennung der Trypsinfragmente 16
8.3.2. Arginin-spezifische Spaltung des MKSV und Reinigung der Fragmente 18
8.3.3. Spaltung des MKSV mit Chymotrypsin, Thermolysin, Endoproteinase Lys-C und der V 8 - Protease 18
9. Konzentrationsbestimmungen viraler Strukturproteine und Peptide 18
10. Molekulargewichtsbestimmungen 18
11. Endgruppenbestimmung viraler Proteine und Peptide 19
11.1. Bestimmung N-terminaler Aminosäuren mit der Dansylchlorid-Methode 19
11.2. Bestimmung C-terminaler Aminosäuren mit der Carboxypeptidase Y 20
12. Gelelektrophorese viraler Proteine und Peptide 20
12.1. Gelelektrophorese viraler Proteine und enzymatischer Verdauungsprodukte 20
12.2. Gelelektrophorese der VP_{Thr}-CNBr-Peptide 21
12.3. Färben der Polyacrylamidgele 21
13. Herstellung virusspezifischer Antiseren 22
13.1. Allgemeines Immunisierungsschema 22
13.2. Immunisierung von STU-Mäusen 22
13.3. Immunisierung von Meerschweinchen 23
13.4. Blutentnahme und Serumgewinnung 23

Seite

14. Nachweis von Antikörpern gegen das MKSV 23
14.1. Serologischer Nachweis von IgG-Antikörpern mit dem indirekten ELISA 23
14.1.1. Herstellung des Konjugats 24
14.1.2. Indirekter ELISA 24
14.1.3. Auswertung des ELISA 24
14.2. Plaque-Neutralisationstest 26
14.2.1. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität 26
14.2.2. Plaque-Neutralisationstest auf BHK 21 - Zellen 26
14.2.3. Auswertung des Plaque-Tests 26
14.3. Mikroneutralisationstest 27
15. Autoradiographie von trägergekuppelten VP_{Thr}-CNBr-Peptiden 27
15.1. Markierung von VP_{Thr}-CNBr-Peptiden mit ^{125}Jod 27
15.2. Kupplung von VP_{Thr}-CNBr-Peptiden an Humanserumalbumin 28
15.2.1. Kupplung mit 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid 28
15.2.2. Kupplung mit Glutardialdehyd 29
15.2.3. Elektrophorese der Kupplungsprodukte und Autoradiographie der Gele 29
16. Immunisierung mit Trägerprotein gebundenen VP_{Thr}-CNBr-Peptiden 29
16.1. Kupplung mit Glutardialdehyd 29
16.2. Kupplung mit 1.3.-Difluor-4.6-dinitrobenzol 29
16.3. Kupplung der VP_{Thr}-CNBr-Peptide an EMF 30
16.4. Immunisierung mit VP_{Thr}-CNBr-Peptidkonjugaten 30
16.5. Antikörpernachweis gegen Trägermoleküle 31

Seite

17. Serologischer Nachweis der Expression klonierter MKSV-Genabschnitte in Lysaten von Escherichia coli-Plasmid-Rekombinanten 31
17.1. Reinigung virusspezifischer Antiseren 31
17.2. ELISA-Standardtechniken 32
17.2.1. Direkter ELISA (DE) 32
17.2.2. Indirekter ELISA (IE) 32
17.2.3. Sandwich-ELISA (SE) 34
17.2. ELISA-Hemmtests 34
17.3.1. Direkter ELISA-Inhibitionstest 34
17.3.2. Indirekter ELISA-Inhibitionstest 34
17.3.3. Sandwich-ELISA-Inhibitionstest 35
17.3.4. Auswertung der Hemmungsversuche 35
18. Abkürzungen 36

D. Ergebnisse 37

1. Versuchsbedingungen für die Immunisierung mit Spaltpeptiden des MKSV-O_1K 37
1.1. Kinetik Plaque-neutralisierender Antikörper gegen VP_{Thr}-CNBr-Peptide 37
1.2. Immunisierungsrouten für VP_{Thr}-CNBr-Peptide 39
2. Immunisierungsversuche mit Proteinen und Peptiden des MKSV-O_1K 40
2.1. Dosisabhängigkeit der Immunantwort gegen das MKSV 40
2.2. Immunantwort gegen die Strukturproteine des MKSV 44
2.3. Immunantwort gegen die Bromcyanpeptide des VP_{Thr} 44
2.4. Immunantwort gegen enzymatische Spaltstücke des MKSV 44
2.4.1. Elektrophorese enzymatischer Spaltpeptide 46
2.4.2. Infektiösität von Enzym-behandelten MKSV-O_1K 46

Seite

2.4.3. Immunisierung mit enzymatisch gespaltenen Peptiden 48

3. Zuordnung chemisch und enzymatisch gespaltener Fragmente im VP_{Thr}-Srukturprotein des MKSV-O_1K 50

3.1. Lokalisierung der Bromcyan- und enzymatischen Fragmente im VP_{Thr} 50

3.2. Lokalisierung immunkompetenter Bereiche des VP_{Thr} 51

4. Versuche zur Steigerung der humoralen Immunantwort gegen die VP_{Thr}-CNBr-Peptide nach dem Hapten-Carrier-Prinzip 54

4.1. Elektrophorese und Autoradiographie radioaktiv markierter VP_{Thr}-CNBr-Peptide 54

4.2. Kupplung radioaktiv markierter VP_{Thr}-CNBr-Peptide an Humanserumalbumin 56

4.3. Immunisierung mit Träger gekuppelten VP_{Thr}-CNBr-Peptiden 57

4.4. Immunisierung mit VP_{Thr}-CNBr-Peptid-EMF-Gemischen 59

5. Expression von MKSV-Genprodukten in Escherichia coli-Plasmid-Rekombinanten 60

5.1. Empfindlichkeit der ELISA-Standardtechniken 60

5.2. Serologischer Nachweis exprimierter viraler Genprodukte in Lysaten von E.coli-pBR 322-Plasmid-Rekombinanten 64

5.2.1. Nachweis des VP_{Thr} in Gemischen von VP_{Thr} und E.coli-HB 101-Lysat 64

5.2.2. Vergleich zweier Aufzuchten verschiedener Klone 64

5.2.3. Nachweis während unterschiedlicher Wachstumsphasen der Rekombinanten 66

5.2.4. Nachweis mit ELISA-Inhibitionstechniken 67

5.3. Serologischer Nachweis des VP_{Thr}-Fusionsproteins in Lysaten von E.coli-pPL VP1-Plasmid-Rekombinanten 69

Seite

5.4. Immunisierungsversuche mit ungereinigten Lysaten 72

5.5. Immunologische Aktivität des VP_{Thr} in VP_{Thr}-E.coli-Lysat-Gemischen 72

E. Diskussion 74

1. Festlegung der experimentellen Parameter 75
2. Immunogenität von Proteinen und Peptiden des MKSV 76
3. Enzymatische Spaltung des MKSV-O_1K 80
4. Lokalisierung immunkompetenter Bereiche des VP_{Thr} 82
5. Versuche zur Verstärkung der humoralen Immunantwort gegen die VP_{Thr}-CNBr-Peptide 87
6. Nachweis exprimierter viraler Genprodukte in Lysaten von E.coli-Plasmid-Rekombinanten 90

6.1. Lysate von E.coli-pBR 322-Plasmid-Rekombinanten 91

6.2. Lysate von E.coli-pPL VP1-Plasmid-Rekombinanten 93

6.3. Immunisierungsversuche mit Lysaten 94

7. Schlußbetrachtung 96

F. Zusammenfassung 97

G. Literaturverzeichnis 100

A. Einleitung

Das Maul- und Klauenseuche-Virus

1. Morphologie

Das Virus der Maul- und Klauenseuche (MKS) gehört zur Familie der Picornaviridae und ist ein 23-25 nm großes Aphthovirus mit ikosaedrischer Struktur (COOPER et al., 1978; MATTHEWS, 1979). Alle zu den Picornaviren gehörenden Genera, die Entero-, Cardio-, Rhino- und Aphthoviren, weisen hinsichtlich molekularer Struktur und Biologie fundamentale Ähnlichkeiten auf (REKOSH, 1977). Die physikalischen Parameter des Maul- und Klauenseuche-Virus (MKSV) sind zusammenfassend von STROHMAIER et al. (1976) beschrieben worden. Das MKSV besitzt ein einsträngiges, ca. 8000 Nukleotide umfassendes RNS-Genom, das von einer Proteinhülle umgeben ist (REKOSH, 1977; HARRIS, 1979). Diese besteht im wesentlichen aus vier Strukturproteinen; die Virusproteine VP_{1-3} liegen dabei zu je 60 Kopien, das VP_4 zu 30 Kopien pro Virion vor (BURROUGHS et al., 1971; VANDE WOUDE et al., 1972; SCRABA, 1979). Die beiden Strukturproteine VP_3 und VP_4 zeigen starke Phosphorylierung (LA TORRE et al., 1980), die Virushülle liegt unglykosiliert und lipidfrei vor (SCRABA, 1979).

Molekulargewichte, terminale Aminosäuren und elektrophoretische Beweglichkeit der Strukturproteine sind weitgehend charakterisiert worden (BACHRACH et al., 1973; STROHMAIER et al., 1974, 1975; MATHEKA et al., 1975, 1977). Auf Grund unterschiedlicher Elektrophoresesysteme, die von den verschiedenen Autoren eingesetzt wurden, ist die Bezeichnung der viralen Strukturproteine jedoch uneinheitlich. Es scheint naheliegend, sich bei der Benennung der Virusproteine auf die N-terminalen Aminosäuren zu beziehen. So weisen alle Picornaviren zwei Strukturproteine auf, die als N-terminale Aminosäuren Glycin (VP_{Gly}) und Asparaginsäure (VP_{Asp}) tragen. Dagegen trägt das dritte

Virusprotein bei allen Aphthoviren Threonin (VP_{Thr}) als N-terminale Aminosäure (ADAM et al., 1974; MATHEKA et al., 1975). Die übrigen Picornaviren haben an dieser Position, soweit bekannt, ein Serin (BUTTERWORTH, 1977; STROHMAIER et al., 1978b).
Auf Grund serologischer Untersuchungen lassen sich sieben MKSV-Typen (A, C, O, Asia 1, SAT 1, SAT 2, SAT 3) unterscheiden, die wiederum in eine Vielzahl von Subtypen untergliedert werden können (BROOKSBY, 1968; FORMAN, 1974; SUGIMURA et al., 1975; RWEYEMAMU et al., 1978; CROWTHER et al., 1979a; RÖHRER et al., 1980).

2. Krankheitsbild und Verbreitung der MKS

Die MKS stellt eine akute, fieberhafte, hochinfektiöse und hochkontagiöse Viruskrankheit der Paarhufer dar. Befallen werden vor allem Rinder und Schweine, ferner auch Schafe, Ziegen und wildlebende Klauentiere (ROSENBERGER, 1970). Auch Nichtklauentiere, wie Meerschweinchen und der Mensch, können ausnahmsweise an der MKS erkranken (VETTERLEIN et al., 1954; PILZ et al., 1965; EISSNER et al., 1967). Das Krankheitsbild beim Rind beinhaltet Störungen des Allgemeinbefindens, Blasenbildung und Erosionen an den Plattenepithelien der Maul- und Zungenschleimhaut und des Verdauungskanals sowie an unbehaarten Stellen der Haut, wie Euterzitzen und Klauen (RÖHRER et al., 1980).
Die MKS ist mit Ausnahme von Neuseeland, Australien und Nordamerika weltweit enzootisch verbreitet (MELNICK et al., 1974), und stellt in Ländern mit hoher Durchseuchungsrate eine der wirtschaftlich bedeutsamsten akuten Tierseuchen dar.

3. Impfprophylaxe gegen die MKS

Um die Ausmaße des volkswirtschaftlichen Schadens niedrig zu halten, versuchte man schon früher die Ausbreitung der MKS aktiv zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden nach Einschleppung der Seuche in einen Klauentierbestand noch

gesunde Tiere künstlich mit dem Epizootievirus infiziert. Dieses Verfahren, Aphthisation genannt, von dem man sich einen milderen Verlauf der Seuche erhoffte, zeitigte jedoch oft katastrophale Folgen (RÖHRER et al., 1980).
Erste Hinweise, daß die MKS mit Hilfe von Schutzimpfungen wirksam bekämpft werden kann, gaben LOEFFLER und FROSCH (1897), die auch zeigten, daß es sich bei dem Erreger der MKS um ein filtrierbares Agens handelt. Das MKSV kann nach Inaktivierung mit Formalin und Adsorption an Aluminiumhydroxyd unter Erhaltung seiner Immunogenität zur aktiven Immunisierung verwendet werden (VALLEE et al., 1926; SCHMID-JENSEN et al., 1936). Hierauf beruhen die klassische WALDMANN-KÖBE-Formalin-Adsorbatvakzine (1938) und die Konzentratvakzine nach PYL (1953). Das zunächst teure Verfahren der Virusgewinnung aus den Zungenaphthen infizierter Rinder wurde von der nach FRENKEL (1947) entwickelten in vitro Methode, nämlich die Gewinnung aus infiziertem Zungenepithelgewebe von Schlachttieren, abgelöst.
Heute wird das MKSV aus infizierten bovinen Zellkulturen gewonnen, und Formalin-inaktiviert, an Aluminiumhydroxyd adsorbiert, zusammen mit Saponin zur aktiven Immunisierung eingesetzt.
Die Inaktivierung des MKSV mit Äthylenimin bzw. Acetyläthylenimin an Stelle von Formalin führt zu einer gleichermaßen immunogenen Vakzine mit geringerem Restinfektiösitätsrisiko (BROWN et al., 1963b; CUNLIFFE, 1973).

B. Erkenntnisstand und eigene Fragestellung

Die Immunisierung von Schweinen und Rindern mit der handelsüblichen, trivalenten, inaktivierten Vakzine gegen die hauptsächlich in Europa auftretenden MKSV-Serotypen A, C und O schützt Schweine mäßig und Rinder gut gegen das MKSV (WITTMANN, 1972). Die Ausbildung der antiviralen Immunität korreliert während vier Wochen nach der ersten Impfung mit dem Auftreten virusneutralisierender Antikörper im Serum von Rindern. Die Nachteile dieser aktiven Immunisierung sind mögliche Fälle von

- Impferkrankungen, bei unvollständig inaktiviertem Virus
- Impfdurchbrüche , bei mangelndem Schutz gegen den ursprünglich geimpften Virustyp und
- Impfschäden , die ursächlich oder vermutbar mit der Impfung in Zusammenhang stehen (wie z.B. Allergien, postvakzinale Enzephalitiden).

Ein besonderes Problem stellt dabei die Tatsache dar, daß mit zunehmenden Viruspassagen in Zellkultur sich auch die Immunogenität des MKSV ändert. Da bei der Attenuierung des Virus in Zellkultur sowohl ein Verlust der Virusvirulenz als auch der Immunogenität auftritt, scheiterten Versuche zur Entwicklung einer Lebendvakzine (WITTMANN et al., 1966).

Der Einsatz eines Impfstoffs, der lediglich das den Impfschutz vermittelnde Protein enthält, würde die obengenannten Risiken der Impferkrankungen gänzlich und der Impfdurchbrüche und Impfschäden auf ein Mindestmaß einschränken. Die Induktion neutralisierender Antikörper wird nur von einem der Hauptstrukturproteine des MKSV, dem VP_{Thr}, vermittelt (LAPORTE et al., 1973; BACHRACH et al., 1975). Eine Immunisierung mit diesem Virusprotein schützt sowohl Schweine als auch Meerschweinchen, - wenn auch nur teilweise -, vor einer MKSV-Infektion (BACHRACH et al., 1975; KAADEN et al., 1977).

Wie für die Subtypen O_1K und A_{12} untersucht wurde, sind Bromcyan gespaltenes VP_{Thr} sowie ein Teil dieser säulenchromatographisch gereinigten Bromcyanpeptide des VP_{Thr} in der Lage, virusneutralisierende Antikörper zu induzieren (KAADEN et al., 1977; ADAM et al., 1978; BACHRACH et al., 1979).

Auf Grund der oben dargelegten Ergebnisse ergab sich für die vorliegende Arbeit folgende Zielsetzung:

1. Die Charakterisierung immunologisch wirksamer Epitope auf dem VP_{Thr}-Strukturprotein des MKSV.
2. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit sich eine humorale Immunantwort gegen entsprechende Epitope in einfachen, nach dem Hapten-Carrier-Prinzip gekuppelten Peptidkonjugaten verstärken läßt.
3. Der serologische Nachweis des gentechnologisch synthetisierten, immunkompetenten VP_{Thr} in Lysaten von Escherichia coli-Plasmidrekombinanten. Die Rekombinanten wurden am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Abt. Prof. P.H. Hofschneider hergestellt.

C. Material und Methoden

1. Virus

In allen Versuchen wurde ein dreimal plaquegereinigtes Isolat des MKSV vom Subtyp O_1K (MKSV-O_1K) verwendet. Das Virus wurde 1966 in Kaufbeuren während eines epizootischen Ausbruchs in Süddeutschland isoliert (BÖHM et al., 1970, 1972).

2. Versuchstiere

2.1. Mäuse

Es wurden männliche und weibliche Mäuse des Inzuchtstamms STU im Alter von 8-14 Wochen verwendet, die aus der hauseigenen Zucht der BFA Tübingen stammten.

2.2. Meerschweinchen

Es wurden 6-7 Monate alte, männliche Albino-Meerschweinchen aus der hauseigenen Zucht eingesetzt.

3. Lösungen und Kulturmedien

Medien für Zellkulturen enthielten 100 Einheiten/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin.

3.1. Lösungen und Medien für die Züchtung und Reinigung des Virus

- Anzuchtmedium für BHK-Zellen

  PM 13 (Fa. Serva, Heidelberg), pH 6,5 , mit folgenden Zusätzen: 15% Kälberserum, 5 g/l Pepton, 8 ml/l Aminosäurelösung, 0,35 g/l Arginin, 0,24 g/l Glutamin, 0,1 g/l Vitamine, 0,01% Eisen(III)-nitrat, 0,07% Inositol.

- Virusimpfmedium

  PM 13, pH 7,7 , jedoch ohne Serum und ohne Aminosäuren, Pepton, Hefeextrakt und Vitamine.

- Virusaufarbeitungspuffer pH 7,6

  7,2 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,2 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, 0,125 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O, 2,2 g $NaHCO_3$, 0,2 g $CaCl_2$ auf 1000 ml bidest. Wasser.

- Polyäthylenglykol-Lösung (PEG-Lösung)

  1 kg PEG wurde in 1l 0,1 M Tris/HCl , pH 7,6 , eingerührt und im Autoklaven 1 Stunde lang bei 110° C gelöst und sterilisiert.

- Erhalter-Puffer pH 7,6

  0,2 M NaCl, 0,05 M Na_2HPO_4 x $2H_2O$

- Saccharose-CsCl-Gradient

  Lösung I : 10% Saccharose in Erhalter-Puffer (w/w)
  Lösung II : 13,33% Saccharose (w/w) und 33,33% CsCl (w/w, Dichte 1,44 g/cm^3) in Erhalter-Puffer

  Mit jeweils 7,5 ml der beiden Lösungen wurde ein linearer Gradient geformt.

- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4 , nach DULBECCO und VOGT (1954)

  8 g NaCl, 0,2 KCl, 1,15 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O, 0,2 g KH_2PO_4, 0,1 g $CaCl_2$, 0,1 g $MgCl_2$ x 6 H_2O auf 1000 ml bidest. Wasser.

- PBS-T

  PBS mit 0,25% Trypsin

3.2. Medien für den Plaque- und Neutralisationstest

- PM 13, pH 7,3 , mit zusätzlich 10% hitzeinaktiviertem, foetalem Kälberserum (FKS).

- Trypanblau-Lösung

  0,16% Trypanblau in physiologischer Kochsalzlösung

- Eagle-Medium mit Zusätzen und 10% FKS

  6,4 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,14 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O, 0,2 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, 0,2 g $CaCl_2$, 4,5 g Glucose, 0,29 g Glutamin, 2,75 g $NaHCO_3$, 0,1 g Vitamine, 2,95 g Tryptose-Phosphat, 5,0 g Pepton-Lactalbumin, 0,1 g Eisen(III)-nitrat, 0,7 g Inositol, 8,0 ml Aminosäurelösung, 0,016 g Phenolrot auf 1000 ml bidest. Wasser. Unmittelbar vor Gebrauch wurde das FKS zugefügt.

- Earle'sche Salzlösung

  6,8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,2 g $CaCl_2$, 0,2 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, 2,2 g $NaHCO_3$, 1,0 g Glucose, 0,125 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O, 0,016 g Phenolrot auf 1000 ml bidest. Wasser.

- Earle'sche Salzlösung, doppelt, mit Zusätzen

  Earle'sche Salzlösung in doppelter Konzentration (außer $NaHCO_3$), mit Zusatz von 10 g/l Lactalbuminhydrolysat, 2 g/l Rinderserumalbumin, 2 g/l Yeast, ohne Phenolrot.

- Neutralrot-Lösung

  0,05%ige wässrige Neutralrot-Lösung wurde 1:5 in doppelt konzentrierter Earle'scher Salzlösung verdünnt.

3.3. Lösungen für die enzymatische Verdauung des MKSV

- Erhalter-Puffer, pH 8,1 , 2:3 verdünnt in bidest. Wasser.
- 0,8% NaCl, 1,2% $NaHCO_3$, pH 8,1 (nur für die V 8 - Protease).

3.4. Lösungen für den ELISA

- Beschichtungspuffer.

  0,05 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$, pH 9,6 , 0,02% NaN_3.

- PBS/Tween 20

  PBS mit 0,05% Tween 20.

- Substratpuffer

  10% Diäthanolamin, pH 9,8 , 0,02% NaN_3.

3.5. Sonstige Lösungen

- Alsever'sche Lösung, pH 6,1

  18,66 g Glucose, 8,0 g Tri-Natriumcitrat-2-Hydrat, 4,16 g NaCl, 0,5 g Zitronensäure auf 1000 ml bidest. Wasser.

4. Reagentien

- 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid:
  Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Agarose Seakem:
  Marine Colloids Inc., Rockland, Maine, USA
- Aminosäurenlösung:
  Difco Lab., Detroit, USA
- Biogel-Säulenfüllungen:
  Bio-Rad Lab., München
- Diäthanolamin:
  Fluka AG, Buchs, Schweiz
- 1.3-Difluor-4.6-dinitrobenzol:
  Fluka AG, Buchs, Schweiz
- Fluorescamin (Fluoram):
  Hofmann La Roche AG, Grenzach
- Ionenaustauscher-Zellulose DEAE 52, CM 32:
  Whatman Biochem. Ltd., Springfield, USA
- ^{125}Jod (als K^{125}J):
  Amersham Buchler, Braunschweig
- Komplettes Freund'sches Adjuvans:
  Difco Lab., Detroit, USA
- Keyhole limpet hemocyanin (KLH, aus Megathura crenulata):
  Päsel KG, Frankfurt
- anti-Maus IgG (Ziege), IgG-Fraktion:
  Cappel Lab. Inc., Cochranville, USA
- Mikrotiterplatten, Dynatech Microtiter, M-29-A:
  Greiner, Nürtingen

- p-Nitrophenylphosphat:
  Boehringer, Mannheim
- Penicillin:
  Grünenthal GmbH, Stolberg
- Petrischalen, 6 cm Durchmesser:
  Greiner, Nürtingen
- Streptomycinsulfat:
  Heyl & Co., Berlin
- N,N,N,N-Tetramethyläthylendiamin (TEMED):
  Fluka AG, Buchs, Schweiz
- Visking Dialyseschläuche:
  Union Carbide, Chicago, USA

Die übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Serva, Heidelberg und Merck, Darmstadt bezogen.

5. Enzyme

- alkalische Phosphatase, Reinheitsgrad I:
  Boehringer Mannheim
- Arginin-spezifische Protease aus der Submaxillarisdrüse der Maus:
  Boehringer Mannheim
- Carboxypeptidase Y:
  Pierce, Rockford, USA
- α-Chymotrypsin:
  Serva, Heidelberg
- Endoproteinase Lys-C:
  Boehringer Mannheim
- Thermolysin:
  Serva, Heidelberg
- Trypsin (TPCK behandelt):
  Worthington, Freehold, USA
- V 8 - Protease:
  Miles Lab., Kankakee, USA

6. Geräte

- Aminosäureanalysator : Liquimat III, Kontron
- CO_2-Brutschrank : Bergmann
- Gammazähler : Berthold Mag 310
- Spektrophotometer : Beckman M 25
  CAMAG TLC-Scanner
  Multiskan-Spektrophotometer
- Zentrifugen : Durchlaufzentrifuge Westphalia LG 205-9
  Minifuge II, Heraeus Christ
  Kryofuge, Heraeus Christ
  Ultrazentrifuge Beckmann, L2-65B

7. Virusgewinnung

7.1. BHK 21-Zellinie (STOKER et al., 1964)

BHK 21-Zellen stellten das Zellsystem für die MKSV-Vermehrung und die Plaque- sowie Neutralisationstests dar. Diese Zellinie wächst als Monolayer-Kultur an Oberflächen von Glas oder eigens für Zellkulturen vorbehandelten Plastikmaterialien.

7.2. Vermehrung der BHK 21-Zellen

BHK 21-Zellen wurden in Rollerrohren (7x35 cm) bei 37° C in 80 ml PM 13-Medium mit Zusätzen angezüchtet. Nach 3 Tagen wurde der dicht ausgewachsene und zusammenhängende Zellrasen durch milde Proteolyse mit 10 ml/Rollerrohr PBS-T-Lösung von der Glasoberfläche abtrypsiniert. Die BHK-Zellen eines Rollerrohrs wurden anschließend auf 3 Rollerrohre verteilt und erneut zur Anzucht gebracht. Zellzählung mit dem Hämozytometer nach dem Trypanblau-Ausschlußtest (C.14.2.1.) ergab durchschnittlich $2x10^8$ lebende Zellen pro Rollerrohr.

7.3. Virusproduktion (STROHMAIER et al., 1976)

Zur Gewinnung größerer Virusmengen wurde das MKSV zunächst vorvermehrt. Hierzu wurden 12 Rollerrohre, deren BHK-Zellrasen ausgewachsen war, mit je 10 ml Viruslösung beimpft, weitere 60 ml Impfmedium zugefügt und bei 37° C inkubiert. Nach 12-14 Stunden traten der zytopathogene Effekt (ZPE, Abrundung und Ablösung der Zellen) und Lyse der Zellen auf. Zur Hauptvermehrung des MKSV wurden die Überstände der Vorvermehrung 1:25 in Impfmedium verdünnt, auf 300 Rollerrohre verteilt und 16 Stunden bei 37° C inkubiert. Restliche, nicht vollständig von der Glaswand abgelöste Zellen wurden abgeschüttelt und mit den virushaltigen Überständen vereinigt.

7.4. Konzentrierung und Reinigung des MKSV

Konzentrierung und Reinigung des Virus sind schematisch in Abb. 1 dargestellt (WAGNER et al., 1970; STROHMAIER et al., 1976). Die vereinigten Überstände (21 l) wurden mit einem Mixer homogenisiert und mittels einer Schlauchpumpe in eine Durchlaufzentrifuge zur groben Abtrennung von Zelltrümmern geführt. Zur Konzentrierung des Virus folgten 2 Fällungen mit 50%iger PEG-Lösung und eine Ausschüttelung mit Arcton (1.1.2-Trichlortrifluoräthan). Der letzte Reinigungs- und Konzentrierungsschritt bestand aus einer isopyknischen CsCl-Saccharose-Gradientenzentrifugation im SW 27 - Rotor bei 18000 UpM 15-16 Stunden lang; Native, intakte 146 S - Viruspartikel banden bei einer CsCl-Dichte von 1,43 g/cm^3 und können mit einem Gradientenabnahmegerät (STROHMAIER et al., 1976) unter Streulicht abgenommen werden. Die Konzentrationsbestimmung des MKSV erfolgte spektrophotometrisch; einer 1%igen Viruslösung wurde die Extinktion 78 (1 cm Küvette; 260 nm) zugrunde gelegt.
Die Virusernte betrug 80-100 mg Virus pro Aufarbeitung.

Virus-Zellsuspension (ca. 21 l)	
Durchlaufzentrifuge	
1. PEG-Fällung:	3 l PEG-Lösung zusetzen, 30 Min. rühren, bei 4000 UpM 10 Min. lang zentrifugieren, Überstände verwerfen; Niederschläge in insgesamt 2,1 l Virusaufarbeitungspuffer aufnehmen und homogenisieren, 30 Min. bei 4° C rühren.
Arcton-Fällung:	40 ml Arcton zufügen, 10 Min. rühren, 15 Min. bei 9000 UpM und 10° C zentrifugieren, mit Scheidetrichter Arctonphase verwerfen.
2. PEG-Fällung:	Zugabe von 0,3 l PEG-Lösung und wie bei der 1. Fällung verfahren; Niederschläge in insgesamt 180 ml Erhalter-Puffer aufnehmen und homogenisieren, 30 Min. bei 4° C rühren, nochmals niedertourig zentrifugieren und Restniederschlag verwerfen.
Isopyknische Zentrifugation im vorgebildeten Dichtegradienten:	15 ml des Viruskonzentrats werden auf 15 ml eines Saccharose-CsCl-Dichtegradienten (C.3.1.) überschichtet und bei 4° C und 18000 UpM 15-16 Stunden lang zentrifugiert (SW 27-Rotor, Nitrocellulosebecher mit Füllkörper: STROHMAIER et al., 1978a).
Abnahme der Virusbande im Streulicht und Dialyse	

Abb. 1: Reinigung und Konzentrierung des MKSV

7.5. Virusaufbewahrung

Die Aufbewahrung des Virus erfolgte, - je nach weiterem Verwendungszweck -, in folgenden Lösungen bei -70° C :

a) 10% Glycerin in Erhalter-Puffer
b) PEG-gefällt in Erhalter-Puffer
c) 10%ige Viruslösung in FKS (für den Neutralisationstest)
d) Erhalter-Puffer (für den ELISA)

a) und b) dienten als Vorrat.

7.6. Virustitration

Die Bestimmung der Plaque-bildenden Einheiten (PBE) wurde nach der COOPER'schen Zellsuspensionstechnik durchgeführt (vgl. C.14.2.2.). Von den Viruspräparationen wurden 10er Verdünnungsschritte in PBS/10% FKS angelegt und jeweils 0,1 ml Viruslösung zu 1 ml Zellsuspension, die 2 x 10^7 BHK 21-Zellen in PM 13-Medium mit Zusätzen enthielt, pipettiert. Nach einer Adsorptionszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Virus-Zellsuspensionen mit den gleichen Volumina 0,6%iger Agarose in Earle'scher Salzlösung bei 40° C durchmischt und in Petriplastikschälchen auf eine feste Agaroseunterlage gegossen. Diese bestand aus 4 ml 0,6%iger Agarose in Earle'scher Salzlösung mit Zusätzen. Nach 2 Tagen konnten die Zellen mit Neutralrot-Lösung angefärbt und die Plaques ausgezählt werden. Neutralrot gehört zu den Vitalfarbstoffen und wird nur von lebenden Zellen aufgenommen. Aus der Anzahl der zählbaren Plaques der entsprechenden Virusverdünnungsstufen wurde der Titer der Viruslösung berechnet und als PBE/ml angegeben (BONIN, 1973).

8. Darstellung viraler Proteine und Peptide des MKSV

8.1. Gewinnung der Strukturproteine (STROHMAIER et al.,1975)

CsCl-gereinigtes Virus (100 mg) wurde zunächst gegen Erhalter-Puffer, dann gegen bidest. Wasser unter 0,1% 2-Mercaptoäthanol (2-ME) dialysiert und auf ein kleines Volumen

eingeengt. Anschließend wurde die RNS mit 67%iger Essigsäure (Endkonzentration) für 10 Minuten im Eisbad gefällt (FRAENKEL-CONRAT, 1957). Nach dieser Säurefällung konnte die RNS und das Strukturprotein VP_4 durch Zentrifugation (6000 UpM, 10 Min. bei 4° C) sedimentiert werden. Der Überstand wurde im Rotationsverdampfer eingeengt, in 2 ml Reduktionspuffer (0,02 M Natriumformiat, pH 3,5 , 6 M Harnstoff, 4% 2-ME) aufgenommen und zur Reduktion der S-S-Gruppen 15 Minuten lang bei 40° C im Wasserbad inkubiert. Nach der Dialyse des Überstands gegen Äquilibrierungspuffer (0,02 M Natriumformiat, pH 3,5 , 6 M Harnstoff, 0,1% 2-ME) wurde das Proteingemisch, welches die Strukturproteine VP_{Gly}, VP_{Asp} und VP_{Thr} enthielt, auf eine CM-Ionenaustauschersäule (0,9x13 cm, Durchflußgeschwindigkeit 12 ml/Stunde) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten (100 ml) von 0,02 M bis 0,1 M Natriumformiat, pH 3,5 mit 6 M Harnstoff und 0,1% 2-ME eluiert und fraktioniert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden bei 280 nm im Spektralphotometer bestimmt und abschließend zweimal gegen Essigsäure dialysiert (VP_{Thr} gegen 5%, VP_{Gly} und VP_{Asp} gegen 30% Essigsäure). Die Proteinlösungen wurden bei - 70° C aufbewahrt.

8.2. Darstellung chemisch gespaltener Peptide des VP_{Thr}

8.2.1. Die Bromcyanspaltung (GROSS et al., 1962; SCHROEDER et al., 1969)

Bromcyan (CNBr) spaltet die Peptidbindung von Proteinen am C-terminalen Ende des Methionin. Dieses wird dabei zu einem C-terminalen Homoserinlacton umgewandelt.
10 mg gereinigtes VP_{Thr} wurden in 1 ml 70%iger Ameisensäure gelöst und mit 150 mg CNBr versetzt. Die Mischung wurde 16-18 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur gerührt, im Rotationsverdampfer bis fast zur Trockene eingeengt, mit bidest. Wasser aufgenommen und nochmals eingedampft. Diese Peptidmischung wird im folgenden als VP_{Thr}-CNBr-Peptide bezeichnet.

8.2.2. Gelchromatographische Auftrennung und Reinigung der VP_{Thr}-CNBr-Peptide (MACHLEIDT et al., 1977)

10 mg VP_{Thr}-CNBr-Peptide wurden in 0,5 ml 80%iger Ameisensäure gelöst und über eine Biogel P 150 - Säule (100-200 mesh, 1,5x150 cm, Durchflußgeschwindigkeit 1,2 ml pro Stunde) mit 80%iger Ameisensäure eluiert. Der Nachweis der Peakfraktionen erfolgte photometrisch bei 280 nm. Zusätzlich wurden die Fraktionen im Differentialrefraktometer vermessen, um solche Peptide zu erfassen, die nicht bei 280 nm absorbieren. Die Auftrennung der Bromcyan-Peptide wurde in der Arbeitsgruppe routinemäßig von Herrn K.-H. Adam durchgeführt.

8.3. Enzymatische Spaltung des MKSV

Alle enzymatischen Verdauungen wurden mit intakten 146 S-Partikeln des MKSV durchgeführt. Vor der Spaltung wurde das gereinigte Virus gegen verdünnten Erhalter-Puffer pH 8,1 dialysiert. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde elektrophoretisch überprüft. Mit Ausnahme der Verdauung mit dem Enzym aus der Submaxillarisdrüse der Maus betrug das Enzym-Substratverhältnis stets 1:50 (w/w). Eine Übersicht der verwendeten Enzyme gibt Tab. 1 .

8.3.1. Trypsinspaltung und säulenchromatographische Trennung der Trypsinfragmente

Zu 1 ml Viruslösung (5 mg) wurden 0,1 ml TPCK behandeltes Trypsin (1 mg/ml, 284 Einheiten(U)/mg) pipettiert und bei 37° C 3 Stunden lang geschüttelt. Anschließend wurde die Mischung dem für die Virusreinigung üblichen CsCl-Dichtegradienten überschichtet und im SW 50 - Rotor 75 Minuten lang bei 45000 UpM zentrifugiert. Nach Abnahme der Virusbande erfolgte die weitere Aufarbeitung wie unter C.8.1. beschrieben. Die beiden aus der Trypsinspaltung erhaltenen, elektrophoretisch nachweisbaren Peptide wurden über eine Biogel P 60 - Säule (100-200 mesh, 1,5x150 cm) mit 5%iger Essigsäure zu 50 Tropfen pro Fraktion eluiert und auf der gleichen Säule rechromatographiert (Nachweis bei 280 nm).

Enzym	Herkunft	Spezifität[a)]	Literatur
Arginin-spezifische Protease	Submaxillarisdrüse der Maus	—Arg$\overset{v}{}$	LEVY et al., 1970
α-Chymotrypsin	Rinderpankreas	—(aromat. AS)$\overset{v}{}$ (Tyr, Try, Phe)	BAILEY, 1967
Endoproteinase Lys - C	Lysobacter enzymogenes	—Lys$\overset{v}{}$	Biochemica Dienst, 1981
Thermolysin	Bacillus thermoproteolyticus Rokko	$\overset{v}{}$(Leu, Ileu, Val, Phe)—	MATSUBARA et al., 1966; HEINRIKSON, 1977
Trypsin	Rinderpankreas	—(Arg, Lys)$\overset{v}{}$	JAMES, 1980
V 8 - Protease	Staphylococcus aureus	—Glu$\overset{v}{}$[b)] —(Glu, Asp)$\overset{v}{}$[c)]	DRAPEAU, 1977

Tab. 1: Übersicht der Enzyme, die für die Spaltung des MKSV verwendet wurden.

a): Angegeben sind nur die starken proteolytischen Aktivitäten: Spaltung am Amino-Ende $\overset{v}{}$AS—, am Carboxyl-Ende —AS$\overset{v}{}$ (AS = Aminosäure).

b): Spaltung in Carbonat-Puffer

c): Spaltung in Phosphat-Puffer

8.3.2. Arginin spezifische Spaltung des MKSV und Reinigung der Fragmente

Die Spaltung des Virus mit der Arginin spezifischen Protease aus der Submaxillarisdrüse der Maus und die Reinigung der beiden Fragmente folgte dem Konzept der Trypsinverdauung. Es wurden 10 Einheiten Protease (0,1 ml) eingesetzt und 3 Stunden bei 37° C geschüttelt.

8.3.3. Spaltung des MKSV mit Chymotrypsin, Thermolysin, Endoproteinase Lys - C und der V 8 - Protease

5 mg Virus (1 ml) wurden mit jeweils 0,1 mg Enzym (0,1 ml) versetzt und für 3 Stunden bei 37° C geschüttelt. Anschließend wurde das Virus wie unter C.8.3.1. beschrieben zentrifugiert und abgenommen. Die Spaltpeptide wurden elektrophoretisch auf Spaltproduktgröße verglichen.

9. Konzentrationsbestimmungen viraler Strukturproteine und Peptide

Die Bestimmung der Konzentration chemisch und enzymatisch gespaltener Peptide wurde in Verbindung mit dem Aminosäureanalysator von Herrn K.-H. Adam durchgeführt. Die Konzentration der Strukturproteine wurde im allgemeinen photometrisch ermittelt. Einer 1%igen Lösung von VP_{Asp} und VP_{Gly} wurde die Extinktion 10,9 , von VP_{Thr} die Extinktion 8,4 (1 cm Küvette, 280 nm) zugrunde gelegt.

10. Molekulargewichtsbestimmungen

Die Molekulargewichte großer Spaltstücke wurden teilweise an Hand der gelchromatographischen Retentionszeiten bekannter Proteine abgeschätzt. Die Molekulargewichtsbestimmungen der hochgereinigten Proteine und Peptide erfolgte in Verbindung mit dem Aminosäureanalysator nach der Methode der minimalen Abweichung der Abstandsquadrate der Aminosäurenmolsummen von ganzen Zahlen (ADAM et al., 1974). Diese statistische Methode führt zu der wahrscheinlichsten Anzahl Aminosäuren und nach Multiplikation mit dem Moleku-

largewicht der jeweiligen Aminosäure zum Molekulargewicht des Peptids. Die Berechnungen dieser Molekulargewichte wurden von Herrn Dr. Strohmaier durchgeführt.

11. Endgruppenbestimmung viraler Proteine und Peptide

11.1. Bestimmung N-terminaler Aminosäuren mit der Dansylchlorid-Methode (GRAY, 1972)

In einem geglühten Glasröhrchen (0,35x9 cm) wurden 0,2-1 nMol Peptid eingetrocknet, der Proteinrückstand in 0,01 ml 0,2 M $NaHCO_3$-Lösung, pH 9,0 , aufgenommen und wiederum eingetrocknet. Die Probe wurde dann in 0,01 ml einer frisch zubereiteten Dansylchlorid-Lösung (2,5 mg/ml in Aceton, unmittelbar vor Gebrauch mit bidest. Wasser 1:2 verdünnt) aufgenommen, 30 Minuten bei 45° C inkubiert und wiederum im Vakuum eingetrocknet. Der Rückstand wurde mit 0,04 ml 6 N HCl versetzt, die Ampulle unter Vakuum in Stickstoffatmosphäre abgeschmolzen, und die Probe 18 Stunden bei 110° C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde anschließend eingetrocknet und in 0,005 ml 95%igen Äthanol aufgenommen. Jeweils 0,001 ml der Probe wurde auf beidseitig beschichtete Polyamidplatten (5x5 cm, Schleicher & Schüll, F 1700) aufgetragen und chromatographiert. Ein Gemisch dansylierter Aminosäuren, das auf der Gegenseite der Platten aufgetüpfelt wurde, diente als Referenz. Die Chromatographie der Proben wurde nacheinander in folgenden Fließmitteln durchgeführt:

1) 1,5%ige Ameisensäure
2) Toluol/Essigsäure 10:1 (v/v)
3) Äthylacetat/Methanol/Essigsäure 20:1:1 (v/v/v)

Mit Fließmittel 2) und 3) wurde 90° zur 1. Laufrichtung chromatographiert. Die Detektion der fluoreszierenden dansylierten Endgruppen erfolgte visuell bei einer Anregungswellenlänge von wahlweise 366 nm oder 254 nm.

11.2. Bestimmung C-terminaler Aminosäuren mit der Carboxypeptidase Y (HAYASHI, 1977)

In 0,13 ml 0,1 M Pyridin-Acetat-Puffer (pH 5,5) mit 0,2% SDS wurden 20 nMole gereinigtes Protein gelöst und 0,02 mg Carboxypeptidase Y zugefügt. Als interner Standard zur quantitativen Bestimmung der freigesetzten Aminosäuren wurden 37,5 nMole Norleucin (4,92 µg in 50 µl Pyridin-Acetat-Puffer) zugesetzt. Das Gesamtvolumen der Reaktionsmischung betrug 0,25 ml. Der C-terminale Abbau erfolgte bei 25° C; 0, 10, 60 und 480 Minuten nach Verdauungsbeginn wurden jeweils 0,05 ml entnommen. Um die Enzymreaktion abzustoppen, wurden 0,05 ml konzentrierte Ameisensäure zupipettiert, und die Mischung im Vakuum eingetrocknet. Nach Aufnahme des Rückstands in 0,15 ml 0,2 N Natrium-Citrat-Puffer (pH 2,2) wurden die freigesetzten Aminosäuren im Aminosäureanalysator bestimmt.

12. Gelelektrophorese viraler Proteine und Peptide

Die Auftrennung der viralen Proteine sowie der enzymatischen Verdauungsprodukte des MKSV erfolgte in einer modifizierten SDS-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970). Die VP_{Thr}-CNBr-Peptide wurden in einer modifizierten Elektrophorese nach SWANK und MUNKRES (1971) aufgetrennt.

12.1. Gelelektrophorese viraler Proteine und enzymatischer Verdauungsprodukte

Die Proteinproben wurden in 0,05 ml Probenlösung (6 M Urea, 2% SDS, 10% Glycerin, 5% 2-ME und 0,001% Bromphenolblau) aufgenommen und zur Proteindissoziation 2-3 Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt. Diese wurden im Sammelgel (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8 , 4% Acrylamid, 0,1% Bisacrylamid und 0,1% SDS) bei 20 mA an der Grenze zum Trenngel konzentriert und im Trenngel bei konstanter Stromstärke von 35 mA getrennt. Das Trenngel enthielt einen Acrylamidgradienten von 10-20% in 0,375 M Tris-HCl pH 8,8 , 20% Glycerin und 0,1% SDS bei einem Acrylamid-Bisacrylamid-

Verhältnis von 40:1,07. Der Elektrophorese-Puffer setzte sich aus 0,025 M Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS zusammen. Polymerisiert wurde mit 0,1% Ammoniumpersulfat und 0,3% TEMED.

12.2. Gelelektrophorese der VP_{Thr}-CNBr-Peptide

Die eingeengten Proteinproben wurden in 0,05 ml Probenpuffer aufgenommen, der 0,01 M H_3PO_4, 8 M Urea, 1% SDS, 1% 2-ME, 0,001% Bromphenolblau enthielt und mit Tris auf pH 6,8 eingestellt worden war. Zur Proteindissoziation wurden die Proben 1 Minute lang im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Im Sammelgel (0,01 M H_3PO_4, 8 M Urea, 5% Acrylamid, 0,25% Bisacrylamid, 0,1% SDS, mit Tris auf pH 6,8 eingestellt) wurden die Peptide bei konstanter Spannung von 30 V (15 mA) an der Grenze zum Trenngel konzentriert. Im Trenngradientengel wurden die Peptide dann nach Molekülgröße und elektrischer Leitfähigkeit bei 70 V (7 V/cm) konstanter Spannung 16 Stunden lang aufgetrennt. Das Trenngel enthielt einen Acrylamid-Gradienten von 12,5% bis 17,5% bei einer Vernetzung mit Bisacrylamid von 1:10 bis 1:7,5 in 0,1 M H_3PO_4, 6 M Urea und 0,1% SDS (mit Tris auf pH 6,8 eingestellt). Jeweils 25 ml der beiden Lösungen wurden mit einem Gradientenmischgefäß in die Elektrophoresekammer gepumpt. Sammel- und Trenngel wurden mit 0,07% Ammoniumpersulfat und 0,075% TEMED polymerisiert. Der Elektrophorese-Puffer bestand aus 0,1 M H_3PO_4 und 0,1% SDS und wurde ebenfalls mit Tris auf pH 6,8 eingestellt. Während des Laufs wurde die Elektrophoresekammer gekühlt.

12.3. Färben der Polyacrylamidgele

Die Gele wurden über Nacht mit 0,1% Coomassie-Brilliantblau R 250 in Eisessig/Methanol/bidest. Wasser (1:3:6, v/v/v) fixiert und gefärbt. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch entfärbt.

13. Herstellung virusspezifischer Antiseren

13.1. Allgemeines Immunisierungsschema

Die Versuchstiere erhielten, wenn nicht anders angegeben, 4 Injektionen in 10tägigen Intervallen. 5 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere geblutet und das Serum gewonnen (Abb. 2). Für die Bestimmung der Kinetik der Antikörperbildung wurde zwischen den einzelnen Immunisierungen ein- bis zweimal Blut genommen. Das Immunisierungsschema orientiert sich am Optimum der Bildung neutralisierender Antikörper gegen das homologe Virus.

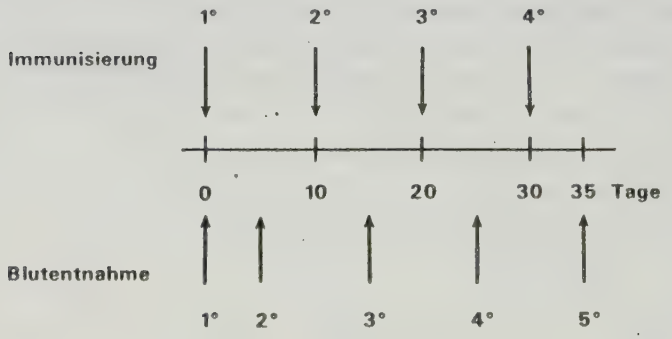


Abb. 2: Immunisierungsschema für Mäuse und Meerschweinchen zur Gewinnung von Antiseren gegen Strukturproteine und Peptide des MKSV-O_1K.

$1^o,...4^o,5^o$ = 1.,...4.,5. Immunisierung bzw. Blutentnahme

13.2. Immunisierung von STU-Mäusen

Proteine und Peptide wurden in PBS/0,1% SDS pH 7,4 gelöst und mit dem gleichen Volumen kompletten Freund'schen Adjuvans (KFA) emulgiert. STU-Mäuse erhielten die bei den Versuchen angegebenen Antigenmengen in 0,1 ml Öl-in-Wasser-

Emulsion intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Jede experimentelle Gruppe enthielt mindestens 5 Tiere.

13.3. Immunisierung von Meerschweinchen

Gruppen von 3-4 Meerschweinchen erhielten die angegebene Antigenmenge mit KFA in 0,1 ml Öl-in-Wasser-Emulsion in 14tägigen Intervallen entweder wechselseitig intramuskulär (i.m.) injiziert, oder als einmalige Injektion in die vier Fußsohlen (4x25 µl). Im letzteren Fall wurde nach 4 Wochen im Abstand von 3-4 Tagen Blut entnommen.

13.4. Blutentnahme und Serumgewinnung

Mäuse wurden rektoorbital, Meerschweinchen durch Herzpunktion geblutet. Das Blut wurde bis zur Ausbildung des Blutkuchens für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann mit 3000 UpM bei 4° C 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und nochmals bei 5600 UpM und 4° C 10 Minuten lang zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in kleinen Portionen zur Inaktivierung des Komplementsystems 30 Minuten bei 56° C inkubiert und bei -25° C aufbewahrt.

14. Nachweis von Antikörpern gegen das MKSV

14.1. Serologischer Nachweis von IgG-Antikörpern mit dem Indirekten ELISA

Der Enzyme linked (labelled) immunosorbent assay (ELISA) wurde von ENGVALL und PERLMANN 1971/72 entwickelt und orientiert sich am Radioimmunassay (RIA) von YALOW und BERSON (1959). Der wesentliche Unterschied besteht in der Markierung: beim ELISA erfolgt diese mit einem Enzym, beim RIA mit einem radioaktiven Isotop.
In allen Versuchen wurden alkalische Phosphatase konjugierte, antispezies spezifische oder antivirale Antikörper verwendet.

14.1.1. Herstellung des Konjugats (AVRAMEAS, 1969)

Alle Schritte der Kupplungsreaktion wurden in silikonisierten Glasgefäßen durchgeführt. 2,5 mg alkalische Phosphatase (400 U/mg) wurden in 1 ml Antikörperlösung (anti-(Maus IgG)-IgG-Antikörper, 1 mg/ml) aufgelöst und zweimal gegen je 1000 ml PBS dialysiert. Die Kupplungsreaktion wurde durch Zugabe von 5 µl Glutardialdehyd während 4 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurde nochmals zweimal gegen PBS dialysiert. Das Konjugat wurde mit 5 mg/ml Rinderserumalbumin stabilisiert und bei 4^{o} C in einem silikonisierten Glasröhrchen aufbewahrt. Die Bestimmung der optimalen Arbeitsverdünnung erfolgte in einer Schachbrett-Titration mit Verdünnungsreihen eines positiven anti-MKSV-Serums und eines negativen Mäuseserums. Die Konjugatverdünnung betrug in den Versuchen $1:2x10^{4}$.

14.1.2. Indirekter ELISA (VOLLER et al., 1976; ABU ELZEIN et al., 1978)

Der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das MKSV im Serum von Mäusen mit dem indirekten ELISA ist in Abb. 3 dargestellt. Der Test wurde im Mikrotiterverfahren mit Einheitsvolumina von 0,2 ml durchgeführt. Mikrotiterplatten wurden mit MKSV-O_1K (10 µg/ml in Beschichtungspuffer) über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Die Platten wurden dann nach einer Standardprozedur dreimal je 3 Minuten lang mit PBS/Tween 20 gewaschen und die Seren in Zweierverdünnungsschritten (ebenfalls in PBS/Tween 20) je zweifach pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37^{o} C wurde dreimal gewaschen, und die Platten mit antispezies spezifischem Konjugat in PBS/Tween 20 für 2 Stunden bei 37^{o} C inkubiert. Die Platten wurden anschließend wiederum dreimal gewaschen und die Substratlösung zupipettiert.

14.1.3. Auswertung des ELISA

Die alkalische Phosphatase spaltet das fast farblose Substrat p-Nitrophenylphosphat in das gelbe p-Nitrophenol und

den Phosphatrest. Dabei ist die umgesetzte Substratmenge der Konzentration an gebundenen Antikörpern proportional und wurde mit dem Multiskan-Spektrophotometer bei 405 nm 45 Minuten nach Substratzugabe gemessen. Die Logarithmen der Serumverdünnungen wurden graphisch gegen die arithmetisch gemittelten Extinktionen aufgetragen. Die Serumverdünnung bei der Extinktion 0,2 wurde als Titrationsendpunkt angegeben (VOLLER et al., 1975).

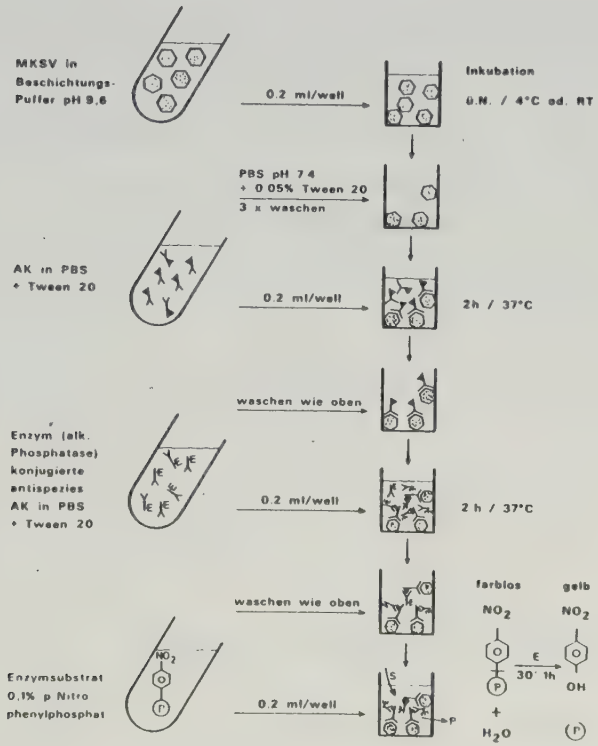


Abb. 3: Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen das MKSV-O_1K mit dem indirekten ELISA

14.2. Plaque-Neutralisationstest (COOPER, 1961)

14.2.1. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Dicht ausgewachsene BHK 21-Zellen wurden abtrypsiniert, einmal in PM 13 - Medium, dem 20% hitzeinaktiviertes Kälberserum zugesetzt worden war, gewaschen und bei 1100 UpM und 4° C 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Zellniederschlag wurde in PM 13 - Medium zuzüglich 10% FKS aufgenommen und die Zellen im Hämozytometer gezählt. Die Vitalität wurde mit dem Trypanblau-Ausschlußtest bestimmt: Trypanblau dringt nur in tote Zellen ein und färbt diese an, lebende Zellen schließen diesen Farbstoff aus. Die Zellsuspension wurde auf $2x10^7$ Zellen/ml eingestellt.

14.2.2. Plaque-Neutralisationstest auf BHK-21-Zellen

Neutralisierende Antikörper wurden in einem Plaque-Reduktionstest mit der COOPER'schen Zellsuspensionstechnik bestimmt. Hierzu wurden Seren 1:2 bis 1:2048 (log_2-Stufen) in PBS verdünnt, und 0,1 ml mit dem gleichen Volumen der Viruslösung (50-80 PBE/0,1ml) versetzt. Jede Serumverdünnungsstufe wurde doppelt ausgeführt. Diese Mischung wurde 90 Minuten zur Virus-Antikörper-Bindung bei Raumtemperatur vorinkubiert und dann zu $2x10^7$ BHK-21-Zellen pipettiert. Nach 30 Minuten Adsorption bei Raumtemperatur wurde mit 1 ml einer 0,6%igen Agaroselösung durchmischt und in Petrischälchen auf eine feste Agaroseunterlage ausgegossen (vgl. C.7.6.). Nach Inkubation von 48 Stunden bei 37° C in 5%iger CO_2-Atmosphäre konnten die Plaques mit einer Dunkelfeldbeleuchtungsapparatur ausgezählt werden.

14.2.3. Auswertung des Plaque-Test

Zur Bestimmung aller Plaques wurde die Zellsuspension mit Neutralrot-Lösung über Nacht bei 4° C oder 2 Stunden bei 37° C angefärbt. Lebende Zellen nehmen den roten Farbstoff auf, Plaques bilden hingegen weiße bis bleich rosa gefärbte Bereiche. Die prozentuale Reduktion der Plaques in den einzelnen Serumverdünnungsstufen gegenüber der Viruskontrolle

wurde berechnet und gegen die Serumverdünnung halblogarithmisch aufgetragen. Es wurde diejenige Serumverdünnung graphisch bestimmt, bei der 20% der Plaques (neutralisierende Dosis ND_{20}) reduziert wurden.

14.3. Mikroneutralisationstest (RWEYEMAMU et al., 1978)

Zur halbquantitativen Titerbestimmung neutralisierender Antikörper wurde der Neutralisationstest in Costarplatten (24 Vertiefungen zu je 2 ml Volumen) durchgeführt. Nach 48 Stunden konnten in den durch Serum geschützten Kulturen und in der Zellkontrolle dicht ausgewachsene Zellrasen beobachtet werden. In der Viruskontrolle (nur Virus und Zellen) konnte sich hingegen kein Zellrasen ausbilden. Die Kulturüberstände wurden abgesaugt und die anhaftenden Zellen mit Neutralrot-Lösung gefärbt. Als Titer wurde diejenige Serumverdünnung angegeben, bei der der Zellrasen noch vollständig erhalten geblieben war.
Die Serumserienverdünnung (0,1 ml) in PBS wurde direkt in den Vertiefungen der Platten durchgeführt und anschließend 0,1 ml Viruslösung zupipettiert. Diese war zuvor so eingestellt worden, daß nach Zugabe frisch präparierter BHK-21-Zellen sich auf Grund des ZPE gerade kein Zellrasen mehr ausbilden konnte. Das Serum-Virus-Gemisch wurde bei Raumtemperatur 1 Stunde vorinkubiert und anschließend 1 ml Zellsuspension ($5x10^5$ Zellen in Eagle-Medium mit Zusätzen und 10% FKS) in jede Vertiefung gefüllt.

15. Autoradiographie von trägergekuppelten VP_{Thr}-CNBr-Peptiden

15.1. Markierung von VP_{Thr}-CNBr-Peptiden mit ^{125}Jod

Die Bromcyan-Peptide wurden nach der Chloramin T - Methode (HUNTER et al., 1962) mit ^{125}Jod (^{125}J) markiert. Zu 0,05 mg Peptide in 0,1 ml PBS/0,1% SDS wurden 5 µl ^{125}J (0,5 mCi) pipettiert, gut durchmischt und 0,025 ml Chloramin T (4 mg/ml) zugefügt. Nach 30 Sekunden wurde die Reaktion mit 0,1 ml Natriumbisulfit-Lösung (2,4 mg/ml) gestoppt und die Mischung sofort auf eine mit der Peptid-Elutionslösung

äquilibrierte Biogel P 2 - Säule aufgetragen (Molekulargewichtsausschlußbereich 2000 d). Die Peptide wurden mit PBS/0,1% SDS eluiert und Fraktionen zu 15 Tropfen gesammelt. Von jeder Fraktion wurde zum einen der Gehalt an Radioaktivität im Gamma-Zähler gemessen. Zum anderen wurde der Proteingehalt durch Auftüpfeln von 5 µl jeder Fraktion auf eine Kieselgelplatte und anschließender Fluorammarkierung bestimmt. Unmarkierte VP_{Thr}-CNBr-Peptide bekannter Konzentration wurden als Referenz für die Proteineichkurve in einer Verdünnungsreihe parallel aufgetragen. Die Kieselgelplatte wurde mehrmals mit 0,03% Fluoram in Aceton (FELIX et al., 1974) besprüht, getrocknet und die Fluoreszenz des fluorammarkierten Proteins bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm in einem automatischen Photometer (CAMAG) gemessen. Die Nachweisempfindlichkeit der Methode betrug 8 µg/ml Protein und korreliert gut mit Ergebnissen von NAKAI et al. (1974). Die radioaktiv markierten Proteinfraktionen wurden vereinigt und die spezifische Aktivität mit $12,4 \times 10^6$ cpm/µg Peptidgemisch bestimmt.

15.2. Kupplung von VP_{Thr}-CNBr-Peptiden an Humanserumalbumin

Radioaktiv markierte VP_{Thr}-CNBr-Peptide wurden mit variierenden Konzentrationen folgender Kupplungsreagentien an Humanserumalbumin (HSA) gebunden.

15.2.1. Kupplung mit 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (GOODFRIEND et al., 1964)

Das Gesamtvolumen der Mischung betrug 0,25 ml, die Endkonzentration an 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (ÄCDI) 0,1% bzw. 0,001% (w/v). Zu 0,25 mg HSA und 0,025 mg VP_{Thr}-CNBr-Peptide in PBS/0,1% SDS wurden 0,2 µg ($2,5 \times 10^6$ cpm) ^{125}J markierte VP_{Thr}-CNBr-Peptide pipettiert. Nach Zugabe von 0,25 mg bzw. 0,0025 mg ÄCDI wurde das Reaktionsgemisch 30 Minuten lang bei Raumtemperatur belassen. Überschüssiges Kupplungsreagenz wurde in einer Mikrodialyse (LAU et al., 1981) gegen 1000 ml PBS/0,1% SDS entfernt.

15.2.2. Kupplung mit Glutardialdehyd

Die unter 15.2.1. beschriebene Proteinmischung wurde mit 0,5%, 0,05% bzw. 0,005% Glutardialdehyd-Lösung (v/v) versetzt und 4 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die Versuchsansätze gegen 1000 ml PBS/0,1% SDS dialysiert.

15.2.3. Elektrophorese der Kupplungsprodukte und Autoradiographie der Gele

Die Überprüfung der Kupplungsfähigkeit der Peptide erfolgte elektrophoretisch nach SWANK und MUNKRES (vgl. 12.2.). Peptidkonjugate und ungekuppelte Peptide wurden in einem Gradientengel (12,5% - 17,5% Acrylamid, Vernetzung 1:10 - 1:7,5 Bisacrylamid) aufgetrennt. Aufgetragen wurde eine Proteinmenge, die 10^5 cpm/Gelbahn enthielt. Sofort nach dem Lauf wurden die Gele in Folie eingeschweißt und während 6 Stunden auf Kodakfilm No Screen autoradiographiert.

16. Immunisierung mit Trägerprotein gebundenen VP_{Thr}-CNBr-Peptiden

VP_{Thr}-CNBr-Peptide wurden an die Trägerproteine Keyhole limpet haemocyanin (KLH) und HSA sowie an Erythrozytenmembranfragmente (EMF) mit folgenden Kupplungsreagentien gebunden, und zur Immunisierung von STU-Mäusen verwendet.

16.1. Kupplung mit Glutardialdehyd

Jeweils 2 mg KLH bzw. HSA wurden mit 0,2 mg bzw. 0,02 mg VP_{Thr}-CNBr-Peptide in 1 ml PBS/0,1% SDS vermischt und 0,15% (Endkonzentration) Glutardialdehyd zugefügt. Die Mischung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur belassen und anschließend zweimal gegen 1000 ml PBS/0,1% SDS dialysiert.

16.2. Kupplung mit 1.3-Difluor-4.6-dinitrobenzol (WOLD, 1972; TAGER, 1976)

Die Kupplung mit 1.3-Difluor-4.6-dinitrobenzol (DFDNB) erfolgte über zwei Reaktionen. Zunächst wurden die Peptide

bei neutralem pH aktiviert. Anschließend wurden die Fluordinitrophenyl-Peptide (FDNP-Peptide) bei hohem pH an das Trägerprotein kovalent gebunden.
In 0,4 ml 7 M Guanidin/HCl, 1% $NaHCO_3$ pH 7,4 wurden 0,4 mg VP_{Thr}-CNBr-Peptide gelöst, und 2 ml einer frisch zubereiteten Lösung von 30 mg/ml DFDNB in Methanol zugefügt. Die Mischung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen, und anschließend dreimal in der Kälte mit Äther überschüssiges DFDNB extrahiert und verworfen. Der restliche Äther wurde durch Einleiten von Stickstoff entfernt. Dann wurden 0,36 mg bzw. 0,036 mg der derivatisierten FDNP-Peptide mit jeweils 3,6 mg KLH bzw. HSA in 0,36 ml 1%igem Natriumborat-Puffer pH 10 gemischt. Der pH-Wert wurde sofort überprüft und, - wenn nötig -, mit 0,01 M NaOH-Lösung korrigiert. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Mischungen gegen 1000 ml PBS/0,1% SDS zweimal dialysiert.

16.3. Kupplung der VP_{Thr}-CNBr-Peptide an EMF

Eine Gans wurde aus der Flügelvene geblutet und das Blut in einem Erlenmeyerkolben mit Alsever'scher Lösung aufgefangen. Leukozyten und Erythrozyten wurden bei 1200 UpM 10 Minuten lang abzentrifugiert, zweimal in Alsever'scher Lösung gewaschen und zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in PBS aufgenommen und im Hämozytometer gezählt. Proben zu 10^8 Erythrozyten/ml wurden bei -70° C gelagert. Die Erythrozyten wurden durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen aufgebrochen, wodurch nach zweimaligem Waschen in PBS die Erythrozytenmembranfragmente (EMF) gewonnen wurden. Die Kupplung der VP_{Thr}-CNBr-Peptide an EMF mit ÄCDI folgt der Beschreibung 15.2.1., S. 28. EMF von 10^9 Erythrozyten wurden mit 0,1 mg Peptide in 1ml PBS/0,1% SDS gemischt und 0,1% ÄCDI zugefügt.

16.4. Immunisierung mit VP_{Thr}-CNBr-Peptidkonjugaten

STU-Mäuse wurden,wie unter 13.2., S. 22, beschrieben, mit obigen Konjugaten immunisiert. Dabei erhielt jede Maus

0,1 mg Trägerprotein mit 0,01 mg bzw. 0,001 mg Peptidanteil viermal i.p. verabreicht.

16.5. Antikörpernachweis gegen Trägermoleküle

Zum Nachweis von Antikörpern gegen die Trägermoleküle KLH und HSA wurde ein indirekter ELISA, wie unter 14.1.2. beschrieben, durchgeführt. Als optimale Beschichtungskonzentrationen erwiesen sich bei KLH 0,01 mg/ml und bei HSA 0,1 mg/ml.

17. Serologischer Nachweis der Expression klonierter MKSV-Genabschnitte in Lysaten von Escherichia coli-Plasmid-Rekombinanten

Die Synthese von MKSV-RNS in komplementäre DNS (c-DNS) mit Hilfe der reversen Transkriptase des Avian-Myeloblastosis-Virus und deren Klonierung in Escherichia coli-Bakterien (E.coli) wurde in den Arbeitsgruppen von Prof. H. Schaller, Universität Heidelberg, und Prof. P.H. Hofschneider, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt (KÜPPER et al., 1981), und die Lysate zur Verfügung gestellt. Der Nachweis viraler Genprodukte in den Lysaten wurde mit verschiedenen ELISA-Standardmethoden und Hemmtechniken geführt. Zur Anwendung gelangten der direkte ELISA (DE), der indirekte ELISA (IE) und der Sandwich-ELISA (SE), außerdem der direkte ELISA-Inhibitionstest (DE-I), der indirekte ELISA-Inhibitionstest (IE-I) und der Sandwich-ELISA-Inhibitionstest (SE-I).

17.1. Reinigung virusspezifischer Antiseren (JATON et al.,1979)

Alle Antikörper, die in den verschiedenen ELISA-Techniken eingesetzt wurden, stammten aus Seren von STU-Mäusen. Die Tiere wurden wie unter 13., S. 22 ff., beschrieben mit infektiösem MKSV-O_1K oder VP_{Thr} immunisiert und geblutet. 4 ml Antiserum wurden mit 36 ml $NaSO_4$-Lösung (18% w/v, Endkonzentration) versetzt, und die Antikörper 2 Stunden bei Raumtemperatur präzipitiert. Der Niederschlag wurde 20 Minuten bei 5600 UpM abzentrifugiert, in 2 ml PBS aufgelöst

und zweimal gegen je 1000 ml 0,0175 M Natriumphosphat-Puffer pH 8,0 dialysiert. Die weitere Reinigung des Antikörperdialysats erfolgte über eine mit obigem Dialysepuffer äquilibrierte DEAE-Anionenaustauschersäule (1x20 cm). Die Säule wurde mit dem Dialysat beladen und mit 0,0175 M Natriumphosphat-Puffer pH 8,0 eluiert. Der Proteingehalt der Peakfraktionen wurde im Spektrophotometer bei 280 nm bestimmt, wobei 1 mg/ml Antikörperlösung einer Extinktion von 1,4 entsprach. Jede proteinhaltige Fraktion wurde im indirekten ELISA auf virusspezifische Antikörper geprüft, und die positiv reagierenden Fraktionen vereinigt. Diese wurden auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Bei zu geringem Proteingehalt wurde die Antikörperlösung mittels Unterdruckdialyse gegen PBS konzentriert. Ein Teil der Antikörperpräparationen wurde mit alkalischer Phosphatase , wie unter 14.1.1, S. 24 beschrieben, konjugiert.

17.2. ELISA-Standardtechniken (Abb. 4a)

Die Tests wurden im Mikrotiterverfahren mit Einheitsvolumina von 0,2 ml durchgeführt.

17.2.1. Direkter ELISA (DE)

E.coli-Lysate wurden in Beschichtungspuffer verdünnt und in Mikrotiterplatten pipettiert. Die Beschichtung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit PBS/Tween 20 wurden enzymkonjugierte anti-MKSV-O_1K- bzw. anti-VP_{Thr}-Antikörper in PBS/Tween 20 zugegeben (Verdünnung 1:250), und 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach der Waschprozedur erfolgte die Substratzugabe, und nach 45 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Extinktionen bei 405 nm im Multiskan Photometer gemessen.

17.2.2. Indirekter ELISA (IE)

Der IE wurde, wie unter 14.1.2., S. 24 beschrieben, durchgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden jedoch mit E.coli-Lysat beschichtet.

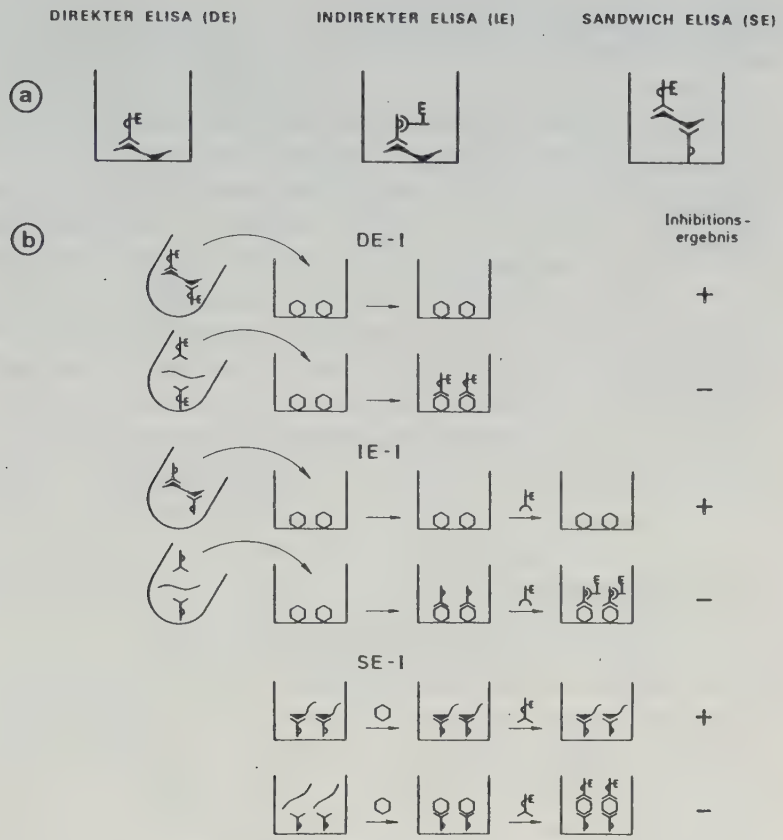


Abb. 4: Nachweis exprimierter viraler Genprodukte in Lysaten von E.coli-Plasmid-Rekombinanten

a) mit ELISA-Standardtechniken; gezeigt sind Anordnungen, die ein pos. Ergebnis ergeben.

b) mit ELISA-Inhibitionstechniken

Protein-Komponente mit (∿) und ohne (—) O_1K-MKSV- und/oder VP_{Thr}-Aktivität aus Lysaten von E.coli MKSV-Plasmid-Rekombinanten

O_1K-MKSV

anti-MKSV- oder anti-VP_{Thr}-Antikörper (STU)

Enzymkonjugierter anti-MKSV- oder anti-VP_{Thr}-Antikörper (STU)

Enzymkonjugierter antispezies-spezifischer IgG-Antikörper

17.2.3. Sandwich-ELISA (SE)

Beim SE wurden Mikrotiterplatten zunächst mit gereinigten anti-MKSV-O_1K- bzw. anti-VP_{Thr}-Antikörpern (0,01 mg/ml in Beschichtungspuffer) über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet und anschließend gewaschen. Lysate von E.coli-Plasmid-Rekombinanten wurden in PBS/Tween 20 verdünnt und in die Platten pipettiert. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37° C und dreimaligem Waschen mit PBS/Tween 20 wurden enzymkonjugierte anti-MKSV-O_1K- bzw. anti-VP_{Thr}-Antikörper (Verdünnung 1:250 in PBS/Tween 20) zugegeben und wiederum 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen und folgender Substratzugabe wurden die Extinktionen im Multiskan-Photometer wie unter 17.2.1. gemessen.
Die Auswertung der ELISA-Versuche erfolgte entsprechend 14.1.3., S. 24.

17.3. ELISA-Hemmtests (Abb. 4b)

17.3.1. Direkter ELISA-Inhibitionstest (DE-I)

Mikrotiterplatten wurden wie unter 14.1.2., S. 24, beschrieben, mit MKSV beschichtet. Enzymkonjugierte antivirale Antikörper wurden 1:250 in E.coli-Lysaten verdünnt und 2 Stunden bei Raumtemperatur vorinkubiert. Jeweils 0,2 ml dieser Mischung wurde in die Mikrotiterplatten pipettiert und weitere 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Substratlösung zugegeben und nach 45 Minuten die Extinktionen bei 405 nm gemessen.

17.3.2. Indirekter ELISA-Inhibitionstest (IE-I)

Verdünnungsstufen von E.coli-Lysaten und anti-VP_{Thr}-Serum wurden 2 Stunden bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend in Virus-beschichtete Mikrotiterplatten pipettiert. Dabei betrug die Verdünnung des Serums $1:10^4$ in PBS/Tween 20 in der Mischung. Die Platten wurden über Nacht bei 4° C inkubiert, anschließend dreimal gewaschen und enzymkonjugierte antispezies spezifische Antikörper zugefügt. Nach 2 Stunden bei 37° C wurden die Platten wiederum

gewaschen, die Substratlösung zugesetzt und nach 45 Minuten bei Raumtemperatur die Extinktionen photometrisch bestimmt.

17.3.3. Sandwich-ELISA-Inhibitionstest (SE-I)

Im SE-I wurden die Mikrotiterplatten entsprechend 17.2.3. mit antiviralen Antikörpern beschichtet, und dann E.coli-Lysate zugegeben. Zur Absättigung freier, Virus spezifischer Antikörperbindungsstellen wurde mit MKSV-O_1K (0,05 mg/ml in PBS/Tween 20) 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen folgte die Inkubation mit homologen, enzymmarkierten antiviralen Antikörpern für 2 Stunden bei 37° C, dann die Substratzugabe mit anschließender Bestimmung der umgesetzten Substratmengen im Photometer.

17.3.4. Auswertung der Hemmungsversuche

Durch die Hemmung antiviraler Seren können exprimierte virale Genprodukte in den Bakterienlysaten nachgewiesen werden. Der Grad der Hemmung wurde folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Ext.(pos.Kontrolle)} - \text{Ext.(exp. Gruppe)}}{\text{Ext.(pos.Kontrolle)} - \text{Ext.(neg.Kontrolle)}} \times 100$$

Ext. = Extinktion exp. = experimentell

Als positive Kontrollen wurden beim DE-I und IE-I das positive virale Antiserum allein eingesetzt. Beim SE-I diente hierzu die klassische Anordnung des Sandwich-ELISA: spezifische virale Antikörper - Virus - enzymkonjugierte virale Antikörper. Um im optimalen Meßbereich des Multiskan-Photometers zu arbeiten, wurden alle Hemmwerte bei der Extinktion 1,2 - 1,5 der positiven Kontrolle berechnet.
Die Extinktion unbeschichteter Vertiefungen der gleichen Platte dienten beim DE-I als negative Kontrolle. Beim IE-I wurde die Extinktion eines negativen Serums in der gleichen Verdünnungsstufe als Negativkontrolle eingesetzt. Die negative Kontrolle des SE-I wurde ohne Lysatkomponenten und MKSV durchgeführt. Diese unspezifischen "Background"-Werte der Negativkontrollen waren stets kleiner als 0,15 Extinktionseinheiten.

18. Abkürzungen

Ci	Curie
CM	Carboxymethyl
cpm	counts per minute; Impulse pro Minute
d	Dalton
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DNS	Desoxyribonukleinsäure
c-DNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme linked (labelled) immunosorbent assay
EMF	Erythrozytenmembranfragmente
fdpd	Fußsohlen
FKS	foetales Kälberserum
HSA	Humanserumalbumin
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KFA	komplettes Freund'sches Adjuvans
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
2-ME	2-Mercaptoäthanol
MKSV	Maul- und Klauenseuche-Virus
PBE	Plaque-bildende Einheiten
RNS	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute

D. Ergebnisse

1. Versuchsbedingungen für die Immunisierung mit Spaltpeptiden des MKSV-O_1K

Die Immunisierung mit Peptiden des MKSV-O_1K erforderte zunächst die Festlegung einiger wichtiger Parameter wie

- die Wahl der Versuchstierspezies
- die Kinetik virusneutralisierender Antikörper
- die Immunisierungsroute für die Peptide
- die Auswahl und Optimierung der Testsysteme zur Antikörperbestimmung.

Für Serienversuche kamen als Antikörperproduzenten Inzuchttierstämme wie Mäuse oder Meerschweinchen in Betracht. MKSV-empfängliche Tiere wie z. B. Schweine, Ziegen oder Rinder schieden für diese Versuche nicht nur aus Kostengründen, sondern auch wegen ihrer genetischen Uneinheitlichkeit aus.

1.1. Kinetik Plaque-neutralisierender Antikörper gegen VP_{Thr}-CNBr-Peptide

Die Immunisierung von STU-Mäusen und Meerschweinchen wurde in 14tägigen Intervallen vorgenommen, wobei jeweils am Tag 7 und 10 nach der entsprechenden Antigeninjektion geblutet wurde. Die Verabreichung von VP_{Thr}-CNBr-Peptiden führte in beiden Tierspezies nach 4 Injektionen in der 7. Woche zu einer optimalen Bildung virusneutralisierender Antikörper (Abb. 5). Neutralisierende Antikörper wurden im Plaque-Reduktionstest mit der COOPER'schen Zellsuspensionstechnik bestimmt, und die Neutralisationstiter bei 20% Plaque-Reduktion angegeben.
STU-Mäuse entwickelten einen maximalen Titer neutralisierender Antikörper von 1:600 nach i.p. Verabreichung von 10 µg CNBr-Peptide/Injektion. Nichtingezüchtete Meerschweinchen dagegen, die intramuskulär (i.m.) nach dem gleichen Schema immunisiert worden waren, erreichten lediglich Antikörpertiter von 1:90 bei 100 µg Peptide/Injektion und 1:58 bei 10 µg Peptide/Injektion (Tab. 2).

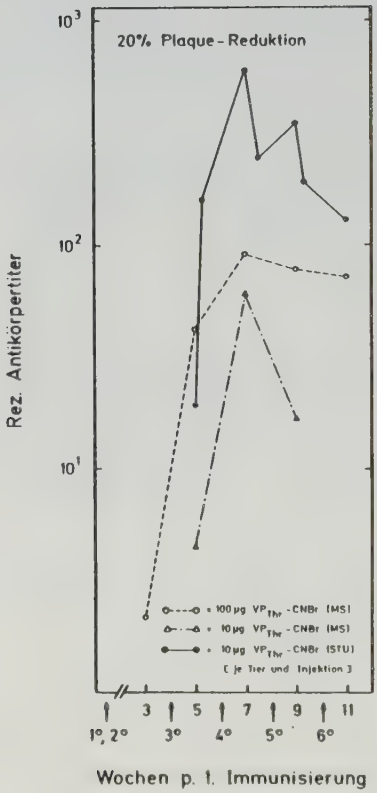


Abb. 5: Vergleich der Kinetiken Plaque-neutralisierender Antikörper gegen VP_{Thr}-CNBr-Peptide in STU-Mäusen (STU) und Meerschweinchen (MS).

1^{o}, ... 6^{o} = 1., ... 6. Verabreichung der Peptide

VP_{Thr}-CNBr-Peptide (µg/Tier u. Inj.)	PNT[a] ($-\log_{10}$) STU-Mäuse	Meerschweinchen
100	-	1.9 (i.m.)
10	2.8 (i.p.)	1.8 (i.m.)
0	<0.3	<0.3
100[b]	-	1.7

Tab. 2: Vergleich der Bildung neutralisierender Antikörper in STU-Mäusen und Meerschweinchen nach Immunisierung mit VP_{Thr}-CNBr-Peptiden.
STU-Mäuse und Meerschweinchen erhielten 10 bzw. 100 µg Peptide mit KFA viermal in 14tägigen Intervallen intraperitoneal (i.p.) bzw. intramuskulär (i.m.) verabreicht. Nach 49 Tagen wurden die Mäuse rektoorbital, die Meerschweinchen durch Herzpunktion geblutet.

a): Titer im Plaque-Neutralisationstest (ND_{20})
b): einmalige Immunisierung in die 4 Fußsohlen

Meerschweinchen, die eine einmalige Injektion von insgesamt 100 µg Peptide, - 25 µg in jede Fußsohle -, erhalten hatten, und 4 Wochen später in regelmäßigen Abständen von 3-4 Tagen geblutet worden waren, entwickelten einen maximalen Antikörpertiter von 1:50 (Tab. 2).
Auf Grund dieser Befunde wurden in allen folgenden Versuchen STU-Inzuchtmäuse, die sich auch in anderen Laboratorien durch ihr gutes Antikörperbildungsvermögen ausgezeichnet hatten (SCHÄFER, 1979), eingesetzt.

1.2. Immunisierungsrouten für VP_{Thr}-CNBr-Peptide

VP_{Thr}-CNBr-Peptide wurden STU-Mäusen verabreicht, und die Antikörperantwort sowohl im Plaque-Neutralisationstest, als auch die gesamte IgG-Antwort im indirekten ELISA bestimmt.

Tab. 3 zeigt, daß die subkutane, intramuskuläre und intraperitoneale Applikation der Peptide, sowie die Fußsohlenimmunisierung zu etwa gleich hohen ELISA-Antikörpertitern führte. Nur durch intraperitoneale und subkutane Applikation sowie durch Fußsohlenimmunisierung konnten auch hinreichend hohe neutralisierende Antikörpertiter induziert werden. Eine schlechte Bildung neutralisierender Antikörper wurde nach intramuskulärer und intravenöser Immunisierung gefunden. Die Fußsohlenimmunisierung induzierte zwar einen geringfügig höheren neutralisierenden Antikörpertiter als die subkutane und intraperitoneale Immunisierung, doch wurde letzterer in allen weiteren Versuchen aus Gründen der Praktikabilität der Vorzug gegeben.
Auf Grund dieser Vorversuche stellten STU-Mäuse die geeignete Tierpopulation zur Durchführung vergleichender Versuche dar. Zweckmäßigerweise wurden die MKSV-Antigene intraperitoneal in 4 aufeinanderfolgenden Injektionen verabreicht.

2. Immunisierungsversuche mit Proteinen und Peptiden des MKSV-O_1K

2.1. Dosisabhängigkeit der Immunantwort gegen das MKSV

Wurden STU-Mäuse mit $\log_{10}$-abgestuften Mengen infektiösen MKSV immunisiert, so ließen sich im Serum der Tiere nach viermaliger Virusapplikation in 10tägigen Intervallen zum Teil beträchtliche Antikörpertiter nachweisen. Abb. 6 zeigt hierzu die typischen ELISA-Kurven: nach Gabe der höchsten eingesetzten Antigendosen von 9 bzw. 0,9 µg/Maus und Injektion , verliefen die Kurven parallel verschoben zueinander und korrelierten in Abhängigkeit der verabreichten Virusmenge. Bei 9 µg/Maus und Injektion ergab sich dabei ein ELISA-Titer von 6.2 ($-\log_{10}$), bei 0,9 µg/Maus und Injektion ein Titer von 5.4 ($-\log_{10}$). Bei niederen Immunisierungsdosen (0,09 bzw. 0,009 µg/Maus und Injektion) glichen sich die ELISA-Kurven immer mehr dem Verlauf der negativen Kontrollkurve der nur mit KFA immunisierten Tiere an.

Immunisierungs-route	PNT-Titer ($-\log_{10}$)	ELISA-Titer ($-\log_{10}$)
s.c.	1.2	5.9
i.m.	0.6	5.9
fdpd	1.5	6.0
i.p.	1.3	6.0
i.v.	0.3	5.4
KFA (i.p.)	<0.3	<3.0
Bordetella pert.*	<0.3	<3.0
PBS/0,1% SDS	<0.3	<3.0

Tab. 3: Immunisierungsrouten für die Immunisierung von STU-Mäusen mit VP_{Thr}-CNBr-Peptiden.
STU-Mäuse erhielten 10 µg Peptide viermal in 10-tägigen Intervallen subkutan (s.c.), intramuskulär (i.m.), in die Fußsohlen (fdpd, 4 x 2,5 µg), intraperitoneal (i.p.) und intravenös (i.v.) verabreicht. Bei allen Applikationen mit Ausnahme der i.v. Verabreichung, wurden die VP_{Thr}-CNBr-Peptide mit KFA injiziert. Intravenös wurden 10 µg Peptide, die mit 10^9 Bordetella pertussis - Organismen gemischt worden waren, verabreicht. Nach 35 Tagen wurden die Tiere geblutet, und die Antikörpertiter im Plaque-Neutralisationstest (PNT) und im indirekten ELISA gegen homologes MKSV bestimmt.

*10^9 Bordetella pertussis - Organismen/Maus und Injektion (Adjuvans-Kontrolle)

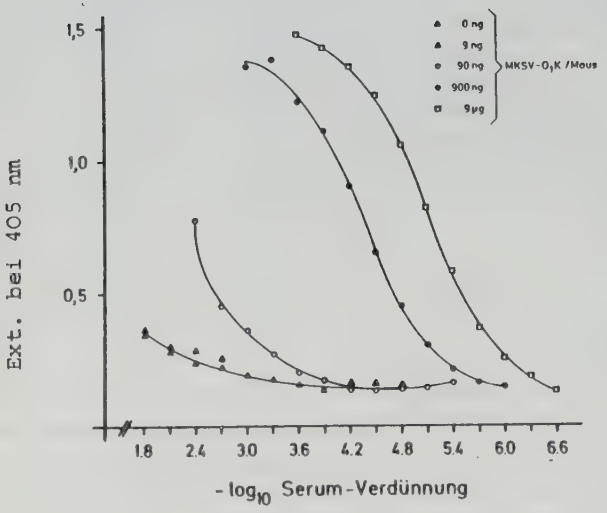


Abb. 6: Dosisabhängigkeit der Immunantwort gegen das MKSV-O_1K in STU-Mäusen

STU-Mäuse erhielten jeweils 9 µg, 900 ng, 90 ng und 9 ng MKSV viermal zusammen mit KFA i.p. in 10tägigen Intervallen injiziert. Nach 35 Tagen wurden die Tiere geblutet und die Seren im indirekten ELISA in Zweierverdünnungsschritten austitriert. Die zugehörigen Neutralisationstiter sind aus Tab. 4 zu entnehmen.

Der indirekte ELISA erwieß sich somit als empfindlicher Nachweis für MKSV-Antikörper. Dies vor allem hinsichtlich der verfügbaren Mengen an Spaltpeptiden, die in den folgenden Versuchen eingesetzt wurden.
Die Bildung neutralisierender Antikörper gegen das Virus und der Vergleich zweier Adjuvantien zeigt Tab. 4. Hohe neutralisierende Antikörpertiter wurden durch 9 µg und 0,9 µg MKSV/Maus induziert, was einer Injektion von 2 x 10^6 bzw 2 x 10^5 PBE entsprach. Auch in diesem Test korrelierten die gefundenen Titer gut mit den verabreichten Virusmengen.
Abgetötete Bordetella pertussis - Organismen erwiesen sich im Vergleich zum KFA, - zumindest bei der höchsten verabreichten Virusmenge -, als schwächeres Adjuvans.

MKSV-O_1K (µg/Maus u. Injektion)	Adjuvans	
	KFA	Bordetella pert.
9,0	1:4096	1:1024
0,9	1: 256	1: 128
0,09	<1: 8	-
0,009	<1: 8	-
0	<1: 8	<1: 8

Tab. 4: Dosisabhängigkeit neutralisierender Antikörper gegen das MKSV in STU-Mäusen und Vergleich zweier Adjuvantien.
STU-Mäuse erhielten infektiöses MKSV mit KFA bzw. Bordetella pertussis - Bakterien (10^9 abgetötete Organismen/Maus und Injektion) viermal in 10tägigen Intervallen verabreicht. Nach 35 Tagen wurden die Tiere geblutet, und die neutralisierenden Antikörpertiter im Mikroneutralisationstest bestimmt.

2.2. Immunantwort gegen die Strukturproteine des MKSV

Die Immunogenität der Hauptstrukturproteine des MKSV wurde in früheren Arbeiten gezeigt (LAPORTE et al., 1973; BACHRACH et al., 1975, 1977, 1979; KAADEN et al., 1977; MELOEN et al., 1979, 1980). An Hand dieser Ergebnisse wurden entsprechende Versuche mit Mäusen durchgeführt. Die Immunisierung von STU-Mäusen mit den gereinigten, strukturellen Untereinheiten führte beim VP_{Thr} und VP_{Asp} zu einem 3- bzw. 6fach höheren ELISA-Titer als beim VP_{Gly} (Tab. 5; STROHMAIER et al., 1980, 1982). Jedoch nur das VP_{Thr} induzierte auch neutralisierende Antikörper, was mit den Ergebnissen obengenannter Autoren übereinstimmt.

2.3. Immunantwort gegen die Bromcyanpeptide des VP_{Thr}

Die Bromcyanspaltung des VP_{Thr} mit anschließender Auftrennung der Spaltprodukte an einer Biogel P 150 - Säule führte zu den Proteinfraktionen CB_0 und CB_{1-4}, wie in Abb. 8a dargestellt. Nach Verabreichung der Fraktionen CB_1 und CB_2 an STU-Mäuse wurden virusneutralisierende Antikörper erhalten (Tab. 5). Die Fraktion CB_0 induzierte zwar ebenfalls neutralisierende Antikörper, bestand jedoch aus einem Gemisch von partiell gespaltenem und ungespaltenem VP_{Thr}, wie aus dem Elektrophoreseprofil zu erkennen war (Daten nicht gezeigt). Mit Ausnahme von CB_4 konnten alle Peptidfraktionen beträchtliche ELISA-Antikörpertiter erzeugen (Tab. 5).

2.4. Immunantwort gegen enzymatische Spaltstücke des MKSV

Die enzymatische Verdauung des intakten 146 S MKSV-Virions führte bei einer ganzen Reihe von Enzymen zu nur zwei, elektrophoretisch nachweisbaren Spaltstücken unterschiedlicher Größe der VP_{Thr}-Strukturuntereinheit. Zu diesen Enzymen zählten Trypsin (T), Chymotrypsin (Ch), Thermolysin (Th), die Arginin-spezifische Protease aus der Submaxillarisdrüse der Maus (A) und die Lysin-spezifische Endoproteinase Lys-C (L). Die beiden anderen Strukturproteine

Immunisierung	PNT-Titer ($-\log_{10}$)	ELISA-Titer ($-\log_{10}$)
Fraktion CB_0	2.4	5.6
Fraktion CB_1	2.9	5.9
Fraktion CB_2	2.1	5.1
Fraktion CB_3	<0.6	4.4
Fraktion CB_4	<0.6	<3.0
VP_{Thr}-CNBr-Pept.	1.9	5.2
VP_{Thr}	2.0	5.1
VP_{Asp}	<0.6	5.4
VP_{Gly}	<0.6	4.6
KFA	<0.6	<3.0

Tab. 5: Immunantwort gegen gereinigte VP_{Thr}-CNBr-Peptide und Strukturproteine des MKSV

STU-Mäuse erhielten jeweils 10 µg der gereinigten Peptide bzw. Strukturproteine zusammen mit KFA i.p. in 14tägigen Intervallen viermal verabreicht. Die Tiere wurden nach 49 Tagen geblutet, und die Antikörpertiter im Plaque-Neutralisationstest und indirekten ELISA bestimmt.

VP_{Asp} und VP_{Gly} wurden hingegen nicht gespalten. Im folgenden wurde untersucht, welche immunologischen Aktivitäten durch die verschiedenen enzymatischen Spaltstücke bedingt werden.

2.4.1. Elektrophorese enzymatischer Spaltpeptide

Nach der enzymatischen Verdauung des gesamten Virions in situ mit Trypsin, Chymotrypsin, Thermolysin, mit der Endoproteinase Lys-C und der Arginin-spezifischen Protease aus der Submaxillarisdrüse der Maus sowie mit der Glutamin- und Asparaginsäure-spezifischen V 8 - Protease, wurden die Verdauungsprodukte im Dichtegradienten zentrifugiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 7). Beide Fragmente der Arginin-spezifischen Spaltung (A_1,A_2) wiesen deutlich größere Molekulargewichte auf als die entsprechenden tryptischen Peptide (T_1, T_2). Die Verdauungsprodukte aus der Lysin-spezifischen Spaltung wichen ebenso wie die Spaltproteine, die mit Chymotrypsin und Thermolysin erhalten wurden, nur geringfügig im Wanderungsverhalten von den tryptischen Peptiden ab. Die V 8 - Protease konnte das im Virion integrierte VP_{Thr} weder in Carbonat- noch in Phosphat-Puffer spalten. Dies deutet darauf hin, daß das VP_{Thr} keine Glutamin- und Asparaginsäure an oberflächlich exponierten Bereichen des Virions zur Spaltung zur Verfügung stellt.

2.4.2. Infektiösität von Enzym-behandeltem MKSV-O_1K

Im folgenden sollte geprüft werden, inwieweit die Infektiösität des MKSV nach Enzymbehandlung reduziert werden kann. Hierzu wurde das MKSV enzymatisch verdaut, einer Gradientenzentrifugation unterworfen und anschließend im Plaquetest austitriert. In Tab. 6 wird die Infektiösität von Enzym-behandeltem mit unbehandeltem Virus verglichen. Obgleich nicht ausgeschlossen werden konnte, daß unvollständig verdautes Virus die Ergebnisse verfälschte, so wird dennoch deutlich, daß Chymotrypsin und insbesondere Trypsin die Infektiösität des Virus drastisch reduzierten.

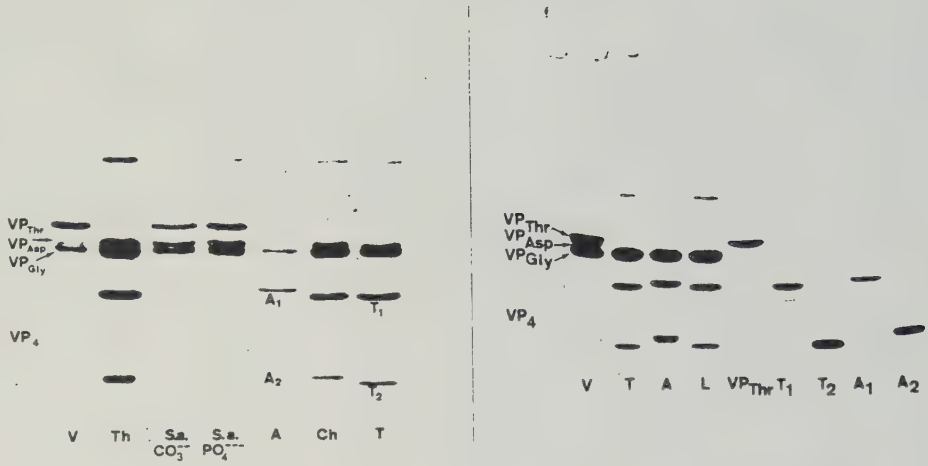


Abb. 7: Elektrophorese enzymatischer Fragmente des MKSV-O_1K

Jeweils 30-40 µg enzymverdautes und unbehandeltes (V) MKSV wurden in einer modifizierten Elektrophorese nach LAEMMLI aufgetrennt.

S.a. = enzymatische Verdauung mit V 8 - Protease aus Staphylococcus aureus in Carbonat (CO_3^{2-})- bzw. Phosphat (PO_4^{3-})-Puffer.

Alle weiteren Abkürzungen siehe Text.

Enzym	PBE/mg MKSV (log_{10})
Trypsin	2.1
Chymotrypsin	3.0
Arginin spez. Protease	4.1
V 8 - Protease	4.3
Endoproteinase Lys-C	3.9
Virus unbehandelt	4.2

Tab. 6: Infektiösität von Enzym-verdautem MKSV-O_1K
Enzym-behandeltes MKSV wurde mittels Gradientenzentrifugation gereinigt und auf BHK 21-Zellen austitriert. Die Plaque-bildenden Einheiten (PBE) wurden aus den Verdünnungsstufen der zählbaren Plaques errechnet.

Dabei inaktivierte Chymotrypsin das Virus um 93,7%, Trypsin um 99,2% (Tab. 6; STROHMAIER et al., 1982). Die reduzierte Infektiösität des MKSV nach Trypsinbehandlung wurde von mehreren Autoren beschrieben (MATHEKA et al., 1962; WILD et al., 1967; vgl. E.3.).

2.4.3. Immunisierung mit enzymatisch gespaltenen Peptiden

STU-Mäuse wurden mit säulenchromatographisch gereinigten und rechromatographierten Peptiden, die nach Trypsin und Arginin-spezifischer Spaltung erhalten wurden, immunisiert. Abb. 7 (rechts) zeigt die zur Immunisierung verwendeten Fragmente A_1 und A_2 sowie T_1 und T_2 des VP_{Thr}, die als elektrophoretisch rein betrachtet werden können. Aus Tab. 7 geht hervor, daß die Höhe der Antikörpertiter im ELISA gegen die Peptide, bis auf das $VP_{Thr/T2}$, insgesamt nur wenig differierten. Von allen enzymatischen Verdauungsprodukten war jedoch nur das $VP_{Thr/A2}$-Fragment noch in der Lage, Plaque-neutralisierende Antikörper zu induzieren, wobei ein Titer von 1:28 erreicht wurde.

Immunisierung	PNT-Titer ($-\log_{10}$)	ELISA-Titer ($-\log_{10}$)
$VP_{Thr/A1}$	<0.3	5.4
$VP_{Thr/A2}$	1.4	5.3
$VP_{Thr/T1}$	<0.3	5.0
$VP_{Thr/T2}$	<0.3	2.7
VP_{Thr}	2.0	5.4
MKSV-O_1K	2.9	5.9
KFA	<0.3	<2.7

Tab. 7: Immunantwort gegen enzymatisch gespaltene Peptide des VP_{Thr}.
STU-Mäuse wurden mit gereinigten Fragmenten aus der tryptischen ($VP_{Thr/T1,T2}$) und Arginin-spezifischen ($VP_{Thr/A1,A2}$) enzymatischen Verdauung des MKSV immunisiert. Es wurden jeweils 10 µg der Peptide mit KFA i.p. viermal in 10tägigen Intervallen verabreicht. Die Tiere wurden nach 35 Tagen geblutet, und die Antikörpertiter im Plaque-Neutralisationstest und im indirekten ELISA gegen MKSV bestimmt.

3. Zuordnung chemisch und enzymatisch gespaltener Fragmente im VP_{Thr}-Strukturprotein des MKSV-O_1K

Mit Hilfe überlappender Bromcyan-Peptide der beiden tryptischen Spaltstücke des VP_{Thr} sowie des gesamten VP_{Thr}, mit Endgruppen- und Molekulargewichtsbestimmungen dieser Proteinstücke, und an Hand von Immunisierungsversuchen mit diesen Fragmenten war es möglich, die Reihenfolge der Peptide und deren immunkompetenten Bereiche im VP_{Thr}-Strukturprotein festzulegen.

3.1. Lokalisierung der Bromcyan- und enzymatischen Fragmente im VP_{Thr}

Die tryptischen Peptide $VP_{Thr/T1}$ und $VP_{Thr/T2}$, sowie das gesamte VP_{Thr} wurden mit Bromcyan gespalten und nacheinander an einer Biogel P 150 - Säule in 80%iger Ameisensäure getrennt. Abb. 8 zeigt die Elutionsprofile und nachfolgende elektrophoretische Auftrennung der Bromcyan-Peptide. Die zusätzliche Bestimmung der terminalen Aminosäuren und Molekulargewichte der Bruchstücke (Tab. 8) gestattete damit die genaue Lokalisierung dieser Fragmente im VP_{Thr}:

- auf Grund der gleichen Positionen im Elutionsdiagramm und in der Elektrophorese, sowie identischen Molekulargewichten und terminalen Aminosäuren, läßt sich das Fragment $T1_2$ zu CB_3 und $T1_3$ zu CB_4 zuordnen.
- $T1_1$ muß aus CB_1 und $T2_1$ sowie $T2_2$ aus CB_1 und CB_2 hervorgegangen sein.
- T1, $T1_2$ und $CB_{3a(3b)}$ müssen N-terminal im VP_{Thr} liegen, da die N-terminalen Aminosäuren Threonin bzw. Prolin identisch sind.
- CB_4 bzw. $T1_3$ muß auf CB_3 bzw. $T1_2$ folgen, da $T1_3$ vollständig in T1 enthalten ist und nicht N-terminal im VP_{Thr} liegt; dann muß $T1_1$ folgen, das von CB_1 überlappt wird.
- CB_2 muß C-terminal lokalisiert sein, da dieses Bromcyan-

peptid kein Methionin C-terminal besitzt.

- $T2_2$ muß partiell identisch mit CB_2 sein, da beide mit Lysin den gleichen N-Terminus besitzen.
- Für $T2_1$ bleibt auf Grund der gleichen N-terminalen Aminosäure Valin nur der N-terminale Bereich von T2 übrig; außerdem muß es C-terminal im CB_1-Peptid lokalisiert sein.
- A1 muß N-terminal, A2 C-terminal im VP_{Thr} liegen, da die entsprechenden terminalen Aminosäuren mit denjenigen des VP_{Thr} identisch sind.

Die unterschiedlichen N-terminalen Aminosäuren des VP_{Thr} (Threonin/Prolin) lassen sich dadurch erklären, daß das VP_{Thr} (und damit auch das CB_3 bzw. $T1_2$) während der Aufarbeitung und der Bromcyanspaltung in 70%iger Ameisensäure zwischen den Aminosäurepositionen 9 und 10 (Asparaginsäure und Prolin; STROHMAIER et al., 1978b) säuregespalten wird. Der Säurebruch an Asparaginsäure-Peptidbindungen ist von SCHULTZ (1967), zwischen Asparaginsäure und Prolin im besonderen von PISZKIEWICZ et al.(1970) und LANDON (1977) beschrieben worden.
Aus obigen Ergebnissen ergibt sich demnach die Reihenfolge der Bromcyan-Peptide im VP_{Thr} eindeutig mit NH_2 - CB_3 - CB_4 - CB_1 - CB_2 - COOH.

3.2. Lokalisierung immunkompetenter Bereiche des VP_{Thr}

Unter Einbeziehung der Ergebnisse aus den Immunisierungsversuchen, können diejenigen Epitope auf dem VP_{Thr}, die neutralisierende Antikörper induzieren, näher charakterisiert werden. Von den Bromcyan-Fragmenten konnten nur CB_1 und CB_2, von den enzymatischen Peptiden konnte nur das A2 der Arginin-spezifischen Spaltung noch neutralisierende Antikörper induzieren (Tab. 5 und 7). Aus den vorangegangenen Folgerungen und der Tatsache, daß A2 ein größeres Molekulargewicht als T2 besitzt (Tab. 8), kann geschlossen werden, daß T2 vollständig in A2 enthalten sein muß. Ein Vergleich der verschiedenen Molekulargewichte von

T1 und T2 zu VP_{Thr} (Differenz ca. 4500 d), von $T1_1$ und $T2_1$ zu CB_1 (Differenz ca. 3500 d), und von $T2_2$ zu CB_2 (Differenz ca. 800 d), macht deutlich, daß nach Trypsinverdauung Peptidstücke aus dem in die Virushülle integrierten VP_{Thr} geschnitten wurden. Die zur Induktion neutralisierender Antikörper immunkompetenten Bereiche müssen demnach in den Aminosäuresequenzen des VP_{Thr} niedergelegt sein, die bei der tryptischen Verdauung verloren gingen.

	Molekulargewichte (D)	Aminosäuren N-terminal	Aminosäuren C-terminal	Biologische Aktivität
VP_{Thr}	23700	Thr	Leu	+
CB_1	13800	– Ö	Met*	+
CB_2	3500	Lys	Leu	+
CB_{3a}	3100	Pro	Met	–
CB_{3b}	3900	Thr	Met	–
CB_4	2100	Asp	Met	–
Trypsinfragment T1	14200	Pro	Arg	–
$T1_1$	7000	–	Arg	n.t.**
$T1_2$	3100	Pro (Thr)	Met	n.t.
$T1_3$	2100	Asp	Met	n.t.
Trypsinfragment T2	5000	Val	Arg	–
$T2_1$	3300	Val	Met	n.t.
$T2_2$	2700	Lys	Arg	n.t.
A1-Fragment	14700	Thr	Arg	–
A2-Fragment	6700	n.t.	Leu	+

* = Methionin wurde nach der CNBr-Spaltung als Homoserin erkannt
** = nicht getestet
Ö = blockiert

Tab. 8: Enzymatisch gespaltene Fragmente und Bromcyan-Peptide des VP_{Thr}.
Zusammenfassende Tabelle aller untersuchten Peptide, die durch chemische oder enzymatische Spaltung aus dem VP_{Thr} bzw. aus den tryptischen Fragmenten (T1, T2) des VP_{Thr} hervorgegangen sind. CB_{1-4}, $T1_{1-3}$ und $T2_{1,2}$ sind Peptide der Bromcyanspaltung. T1, T2, A1 und A2 stellen die VP_{Thr}-Spaltprodukte der enzymatischen Verdauung des MKSV in situ mit Trypsin bzw. mit der Argininspezifischen Protease (A1, A2) dar.

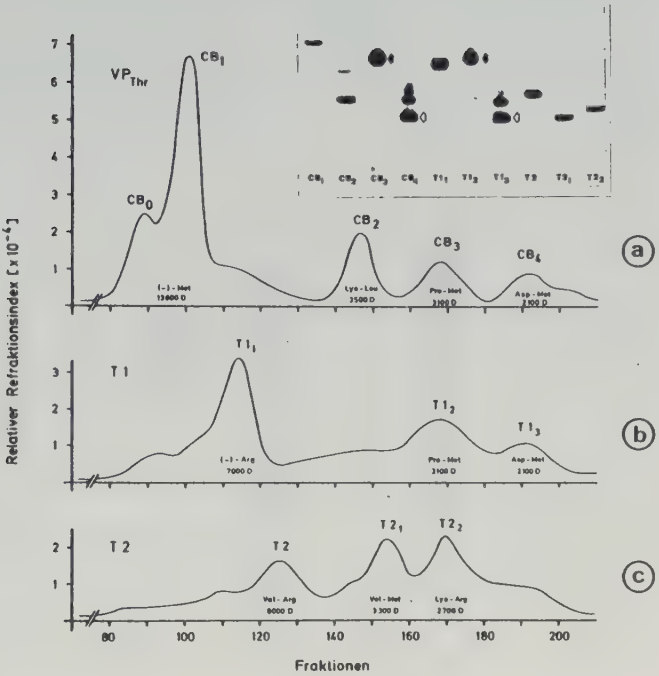


Abb. 8: Elutionsprofile und Elektrophorese der Bromcyanpeptide des VP_{Thr}, $VP_{Thr}/T1$ und $VP_{Thr}/T2$
Bromcyanspaltung und Auftrennung der Bromcyanpeptide des VP_{Thr} (a), der tryptischen VP_{Thr}-Spaltprodukte T1 (b) und T2 (c) an einer Biogel P 150 - Säule. Die terminalen Aminosäuren und die Molekulargewichte der Peptide sind unter den Peaks angegeben. Die elelektrophoretische Auftrennung der einzelnen Fraktionen im SDS-Polyacrylamidgel ist oben rechts eingefügt. Identische Peptide sind in der Elektrophorese mit ausgefüllten und offenen Pfeilen markiert.

4. Versuche zur Steigerung der humoralen Immunantwort gegen die VP_{Thr}-CNBr-Peptide nach dem Hapten-Carrier-Prinzip

Die Verstärkung der humoralen Immunantwort gegen kleine und kleinste Moleküle nach dem Hapten-Carrier-Prinzip erfordert die Kooperation von T-Helfer- und B-Lymphozyten (MLLER et al., 1965, 1969; CLAMAN et al., 1969; RAJEWSKY et al., 1969), und wurde in vielen Laboratorien bereits mit Erfolg durchgeführt (ANDERER et al., 1963, 1965; LÜBKE et al., 1978). Kleine Moleküle (Haptene) mit Molekulargewichten unter 3000 d können von sich aus im allgemeinen keine Antikörper induzieren. Kuppelt man jedoch diese an hochmolekulare, immunogene Trägermoleküle (Carrier) kovalent und immunisiert man mit solchen Komplexen Versuchstiere, so werden im allgemeinen auch gegen die gekuppelte, niedermolekulare Komponente des Hapten-Carrier-Komplexes Antikörper gebildet.
Da die Aufbereitung der für die Bildung neutralisierender Antikörper immunkompetenten Viruskomponenten des MKSV (VP_{Thr}, A2, CB_1 und CB_2) aufwendig ist, erschien es naheliegend, die VP_{Thr}-Spaltpeptide an Trägermoleküle kovalent zu binden, um so eine Steigerung der humoralen Immunantwort gegen diese Peptide zu erreichen.

4.1. Elektrophorese und Autoradiographie radioaktiv markierter VP_{Thr}-CNBr-Peptide

Abb. 9 zeigt die elektrophoretische Auftrennung und Autoradiographie der mit ^{125}Jod markierten Peptide. In (a) wurde 30 Sekunden, in (c) und (d) jeweils 45 Sekunden jodiert. Im Vergleich zur unmarkierten Peptidauftrennung (b) wird deutlich, daß nur die Fraktionen CB_1, CB_2 und $CB_{3a,b}$ jodierbar waren, nicht jedoch die Fraktion CB_4. Demnach enthält dieses Peptid kein Tyrosin und kein Histidin. Aminosäureanalysen und die Aufklärung der Nukleinsäuresequenz des VP_{Thr} bestätigten diesen Befund (KURZ et al., 1981).

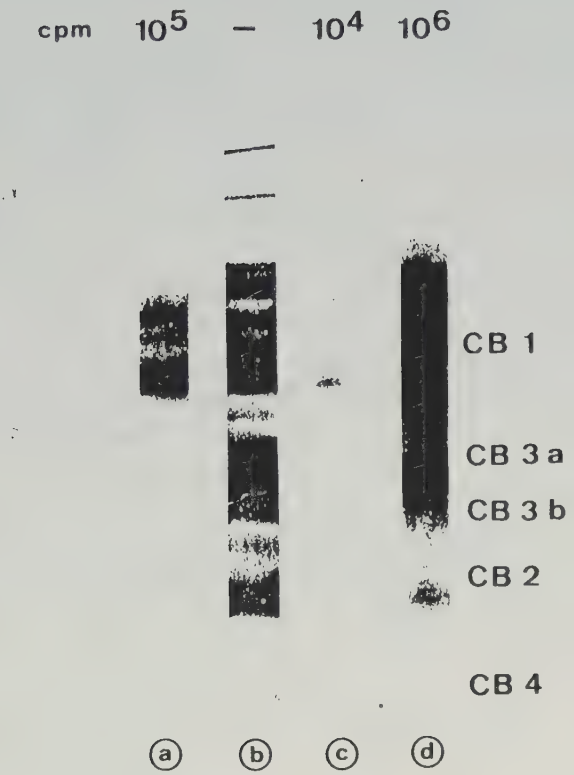


Abb. 9: Autoradiographie ^{125}J markierter VP_{Thr}-CNBr-Peptide

VP_{Thr}-CNBr-Peptide wurden nach der Methode von HUNTER et al.(1962) mit ^{125}J markiert, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend autoradiographiert. Aufgetragen wurden Peptidmengen, die 10^4 - 10^6 cpm/Gelbahn enthielten. In der Spalte (b) wurden 0,1 mg Bromcyan-Peptide aufgetragen und nach der Elektrophorese mit Coomassie-Brilliantblau R 250 angefärbt.

4.2. Kupplung radioaktiv markierter VP_{Thr}-CNBr-Peptide an Humanserumalbumin

Die Kupplung jodierter Bromcyan-Peptide an HSA mit variierenden Konzentrationen von Glutardialdehyd (GLDA) und 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (ÄCDI) zeigt Abb. 10. Aus der Autoradiographie geht hervor, daß 0,5 - 0,05% GLDA für eine zufriedenstellende Bindung der Peptide an HSA ausreichend waren. Dagegen konnte 0,1% ÄCDI die Peptide nur unzureichend an die Trägermoleküle kuppeln. An HSA gebundene Peptide verblieben auf Grund der hohen Molekulargewichte dieser Komplexe (70000-82000 d) am Anfang des Gradiententrenngels (Abb. 10). Die Kontrolle enthielt 8 ng (10^5 cpm) radioaktiv markierte und 0,01 mg unmarkierte VP_{Thr}-CNBr-Peptide, die mit 0,1 mg HSA gemischt worden waren.

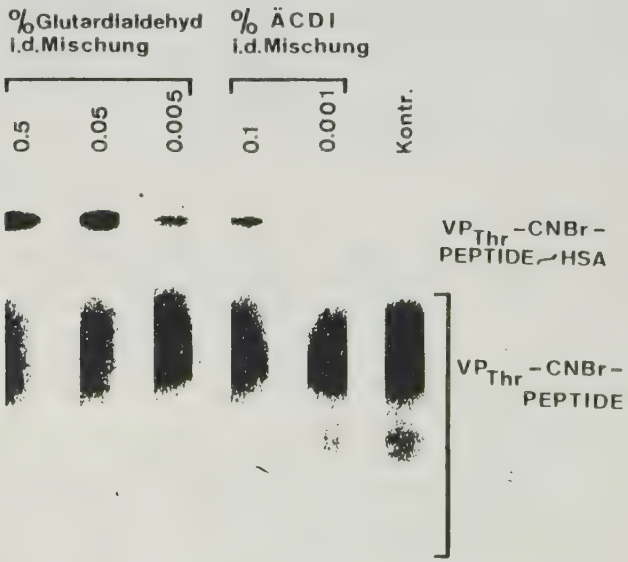


Abb. 10: Autoradiographie an HSA gekuppelter, ^{125}J markierter VP_{Thr}-CNBr-Peptide

4.3. Immunisierung mit Träger gekuppelten VP_{Thr}-CNBr-Peptide

VP_{Thr}-CNBr-Peptide wurden mit den Kupplungsreagentien GLDA und 1.3-Difluor-4.6-dinitrobenzol (DFDNB) an die Trägerproteine HSA und KLH gekuppelt. Mit diesen Konjugaten wurden STU-Mäuse unter optimierten Bedingungen, wie sie für die Bromcyan-Peptide des VP_{Thr} ermittelt worden waren, immunisiert. Die Tiere wurden, wie unter C.13.1., S. 22 beschrieben, mehrmals zwischenzeitlich geblutet, und die Antikörpertiter gegen das MKSV, HSA und KLH im indirekten ELISA bestimmt. Tab. 9 zeigt den Immunstatus der Tiere gegen die genannten Proteine nach der vierten Antigeninjektion. In allen Experimenten konnte weder die humorale Immunantwort gegen die VP_{Thr}-CNBr-Peptide in den Konjugaten gesteigert, noch konnten die Antikörpertiter der isoliert verabreichten Peptide erreicht werden (Tab. 9E). Lediglich gegen die VP_{Thr}-CNBr-Peptide, die mit GLDA an HSA gekuppelt worden waren, ließen sich Antikörper im ELISA nachweisen (Tab. 9A). Der Antikörpertiter lag dabei in der gleichen Größenordnung, als wären 1 µg der Peptide isoliert verabreicht worden, und könnte unter Umständen von unvollständig gekuppelten Peptiden induziert worden sein. Neutralisierende Antikörper konnten nur in der Kontrollgruppe E bei 1 µg und 10 µg Peptide/Maus und Injektion und in geringem Maße in der Gruppe A bei 10 µg gekuppelten Peptiden/Maus und Injektion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Immunantwort gegen den Carrieranteil HSA bzw. KLH der Komplexe war dagegen in allen experimentellen Gruppen gleichbleibend gut (Vergleich der Antikörpertiter von A und B zu F, von C und D zu G). Die Behandlung der Trägerproteine alleine mit GLDA ließ keine Veränderung im Antikörperbildungsvermögen gegenüber den unbehandelten Trägern erkennen (Tab. 9F und G).

Die Kupplung der Bromcyan-Peptide an Gänse-Erythrozytenmembranfragmente (EMF) mit ÄCDI führte ebenfalls zu keiner verstärkten Immunantwort gegen diese Peptide, obgleich bei

der Kupplung von ^{125}Jod markierten VP_{Thr}-CNBr-Peptiden an diese Membranfragmente 70-80% der eingesetzten Radioaktivität in der dreifach gewaschenen und abzentrifugierten Membranfraktion verblieb.

	Immunisierung (µg Peptidanteil/Maus u. Inj.)	ELISA-Titer ($-\log_{10}$) gegen MKSV-O_1K	HSA	KLH
A	VP_{Thr}-CNBr-HSA (GLDA)			
	10	4.7	4.6	<3.0
	1	<3.0	5.1	<3.0
B	VP_{Thr}-CNBr-HSA (DFDNB)			
	10	<3.0	5.1	<3.0
	1	<3.0	4.9	<3.0
C	VP_{Thr}-CNBr-KLH (GLDA)			
	10	<3.0	<3.0	5.1
	1	<3.0	<3.0	5.5
D	VP_{Thr}-CNBr-KLH (DFDNB)			
	10	<3.0	<3.0	5.1
	1	<3.0	<3.0	5.1
E	VP_{Thr}-CNBr-Peptide			
	10	5.3	<3.0	3.3
	1	4.8	<3.0	3.6
	0.1	<3.0	<3.0	3.9
F	HSA (GLDA)	<3.0	5.2	<3.0
	HSA	<3.0	5.2	<3.0
G	KLH (GLDA)	<3.0	<3.0	5.4
	KLH	<3.0	<3.0	5.5
H	KFA	<3.0	<3.0	3.3

Tab. 9: Immunisierung von STU-Mäusen mit Träger gekuppelten VP_{Thr}-CNBr-Peptiden
Die Peptide wurden,wie in der Tabelle angegeben, mit GLDA oder DFDNB an jeweils 0,1 mg HSA bzw. KLH gekuppelt und den Tieren verabreicht. Weitere Erläuterungen siehe Text.

4.4. Immunisierung mit VP_{Thr}-CNBr-Peptid-EMF-Gemischen

In diesem Versuch sollte geprüft werden, wie sich das Antikörperbildungsvermögen gegen die Bromcyan-Peptide in der Mischung mit anderen immunogenen Komponenten ändert. Die Immunisierung von STU-Mäusen mit Gemischen aus VP_{Thr}-CNBr-Peptiden und EMF führte zu einer verminderten Antikörperbildung gegenüber den Bromcyan-Peptiden (Tab. 10). Dabei fiel der ELISA-Titer gegenüber den isoliert verabreichten Peptiden um so mehr ab, je geringer die Konzentration der Peptide in der Mischung war. Virusneutralisierende Antikörper konnten nur bei den Tieren nachgewiesen werden, welche die Bromcyan-Peptide allein verabreicht bekommen hatten. Bei letzteren betrugen die Neutralisationstiter 1:120 bei 10 µg und 1:10 bei 1 µg Peptide/Maus und Injektion. Keine virusneutralisierenden Antikörper konnten dagegen 0,1 µg Peptide induzieren.

	VP_{Thr}-CNBr-Peptide	
µg/Maus u. Injektion	+ EMF	- EMF
10	3.7	5.4
1	<3.0	4.8
0.1	<3.0	<3.0
0	<3.0	<3.0

Tab. 10: Reduktion der humoralen Immunantwort gegen VP_{Thr}-CNBr-Peptide in Mischungen mit EMF

STU-Mäuse wurden, wie in der Tabelle angegeben, mit Gemischen aus VP_{Thr}-CNBr-Peptiden und EMF von 10^8 Gänse-Erythrozyten i.p. mit KFA viermal in 10tägigen Intervallen immunisiert (+ EMF). Als Kontrolle wurden den Mäusen die Peptide ohne EMF verabreicht (- EMF). Die Tiere wurden nach 35 Tagen geblutet und die Antikörpertiter im indirekten ELISA bestimmt.

5. Expression von MKSV-Genprodukten in Escherichia coli-Plasmid-Rekombinanten

Die Klonierung der c-DNS des MKSV und die Expression der viralen Genprodukte in E.coli sind in einer gemeinsamen Arbeit publiziert worden (KÜPPER et al., 1981). Im folgenden soll eine Auswahl serologischer Experimente dargelegt werden, die im Laufe der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. P.H. Hofschneider am Max - Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt wurden. Virale Aktivitäten in Lysaten von E.coli-Plasmid-Rekombinanten wurden mit ELISA-Standard- und Inhibitionstechniken nachgewiesen. Gleichzeitig wurden die Lysate im Radioimmunassay nach BROOME und GILBERT (1978) in der Arbeitsgruppe Prof. P.H. Hofschneider geprüft.
Untersucht wurden Tetracyclin-resistente/Ampicillin-sensitive (Tet^r/Amp^s) Klone von Rekombinanten, deren MKSV-c-DNS-Insertion genau charakterisiert worden war. Eine Auswahl verschiedener Rekombinanten und die Charakterisierung der MKSV-c-DNS mit Hilfe einer Reihe von Restriktionsendonucleasen zeigt Abb. 11. Die dargestellten Klone überdecken den größten Teil des Virusgenoms. Im folgenden wurden einzelne Rekombinanten auf Expression viraler Genprodukte in den Bakterien untersucht.

5.1. Empfindlichkeit der ELISA-Standardtechniken

Zum Nachweis prokaryontisch synthetisierter viraler Proteine wurde zunächst die Empfindlichkeit der ELISA-Techniken geprüft. Hierzu wurden der direkte ELISA (DE), der indirekte ELISA (IE) und der Sandwich-ELISA (SE) in Abhängigkeit variabler Viruskonzentrationen miteinander verglichen (Abb. 12). Beim DE und IE wurden die Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen beschichtet. Die Konzentrationen der eingesetzten Seren, Konjugate und Antikörperpräparationen waren zuvor für diesen Versuch optimiert worden. Die Testprozeduren folgen der Beschreibung in C.17.2., S. 32.

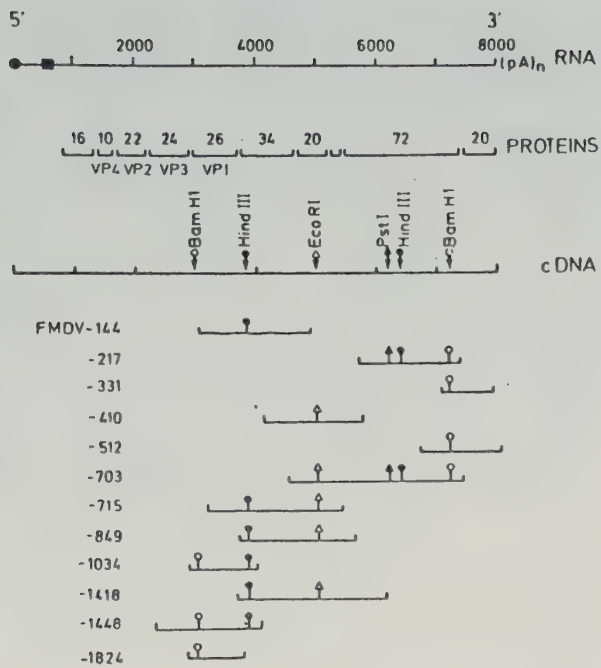


Abb. 11: Charakterisierung und Lokalisierung klonierter MKSV-c-DNS-Fragmente (KÜPPER et al., 1981)
In den beiden oberen Reihen ist die Organistion des MKSV-Genoms dargestellt: die einzel-(+)-strängige RNS mit ca. 8000 Nukleotiden und der Proteinvorläufer mit den Strukturproteinen VP_4, VP_2 (=VP_{Asp}), VP_3 (=VP_{Gly}) und VP_1 (=VP_{Thr}). In der 3. Reihe ist die c-DNS der MKSV-RNS mit den Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonucleasen angegeben. Unter der c-DNS sind Rekombinanten-Klone aufgeführt, deren inserierte MKSV-c-DNS-Fragmente nach Molekulargewicht und Position im Virusgenom kartiert worden waren.

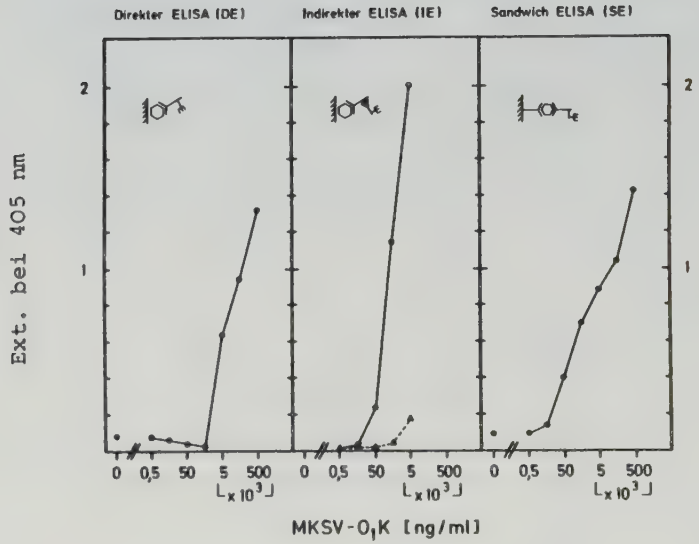


Abb. 12: Vergleich dreier ELISA-Techniken

Mikrotiterplatten wurden mit variablen Konzentrationen von MKSV (DE, IE) bzw. mit 10 µg/ml antiviralen Antikörpern (SE) beschichtet. Im oberen Feld sind Testanordnungen wiedergegeben, die zu einem positiven Ergebnis führen. Ausgefüllte Kreise geben den Kurvenverlauf in Abhängigkeit der Viruskonzentration wieder. Die Dreiecke beim IE zeigen die unspezifische Reaktion eines negativen Kontrollserums, das von Mäusen stammte, die 50 µl KFA und 50 µl PBS injiziert erhalten hatten. Die Serumverdünnungen betrugen $1:10^3$.

Der DE erwies sich mit einer Nachweisgrenze von 0,5 - 5 µg/ml MKSV als unempfindlichster Test. Die Empfindlichkeit ließ sich im IE um den Faktor 10 (50 ng/ml Virus) unter Verwendung eines antiviralen Serums und eines antispezies spezifischen Konjugats steigern. Der SE schließlich war in diesen Versuchen nur wenig empfindlicher als der IE. Hier lag der Nachweisbereich bei 5 - 50 ng/ml MKSV. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit den Befunden von CROWTHER et al., 1979b) überein.
Abb. 13 zeigt, daß die relative Unempfindlichkeit des DE unabhängig von der eingesetzten Konjugatverdünnung war. Diese hatte lediglich einen Einfluß auf den Kurvenverlauf, - da die Steigung der ELISA-Kurve der Konzentration des Konjugats proportional ist -, nicht jedoch auf die Ermittlungsgrenze des Virus.

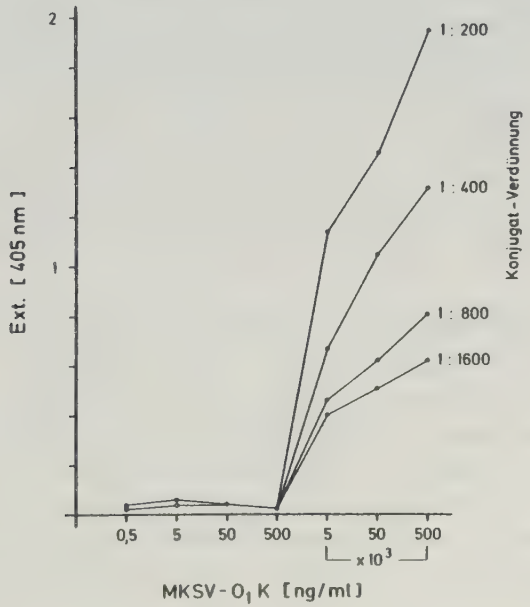


Abb. 13: Konzentrationsabhängigkeit des Konjugats im DE

5.2. Serologischer Nachweis exprimierter viraler Genprodukte in Lysaten von E.coli-pBR 322-Plasmid-Rekombinanten

5.2.1. Nachweis des VP_{Thr} in Gemischen von VP_{Thr} und E.coli-HB 101-Lysat

In den folgenden beiden Versuchen sollte geklärt werden, in welchen Konzentrationen das VP_{Thr} in Lysatmischungen nachweisbar ist. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen VP_{Thr} (0,05 - 5 µg/ml) mit einer konstanten Verdünnung (1:10) des E.coli-HB 101-Lysats ohne MKSV-Insertion gemischt. Mikrotiterplatten wurden mit diesen Mischungen bei pH 9,6 beschichtet und anschließend im DE mit enzymkonjugierten anti-VP_{Thr}-Antikörpern inkubiert. Tab. 11a zeigt das Ergebnis des Rekonstitutionsexperiments. Noch 5 µg/ml VP_{Thr} ließen sich in dem 1:10 verdünnten Lysat eindeutig nachweisen.
Wird dagegen das E.coli-Lysat mit konstanter VP_{Thr}-Konzentration verdünnt, so läßt sich das Strukturprotein mit abnehmender Konzentration an Fremdprotein zunehmend nachweisen (Tab. 11b). Auch in dieser Versuchsanordnung waren 5 µg/ml VP_{Thr} eindeutig nachweisbar.
Da die Ergebnisse im IE (nicht gezeigt) nur unerheblich besser als im DE ausfielen, wurde im folgenden der DE auf Grund seiner schnelleren Durchführbarkeit eingesetzt.

5.2.2. Vergleich zweier Aufzuchten verschiedener Klone

Die Lysate der Rekombinanten-Klone 144, 703 und des parentalen Kontrollstamms HB 101 zweier Aufzuchten wurden im DE mit enzymkonjugierten anti-MKSV-O_1K-Antikörpern verglichen (Tab. 12). Dabei zeigte sich, daß der Klon 703 im Laufe der Anzucht die Fähigkeit zur Expression eines viralen Genprodukts verlor. Der zunächst inaktive Klon 144 dagegen entwickelte nach erneuter Kultivierung beträchtliche Aktivitäten. Wie aus Tab. 12 hervorgeht, war das Lysat dieses Klons der 1. Aufzucht im DE negativ, die 3. Aufzucht reagierte dagegen stark positiv. Der Kontrollstamm reagierte im DE, wie erwartet, immer negativ.

ⓐ

VP_{Thr} (µg/ml)	+ HB 101	- HB 101
5	0.32	> 2
0.5	0.11	1.56
0.05	0.09	0.03
0	0.01	0.01

ⓑ

HB 101 - Verd. ($-\log_{10}$)	+ VP_{Thr}	- VP_{Thr}
1	0.36	0.07
2	3.26	0
3	6.10	0.01
-	7.16	0.01

Tab. 11: Nachweisgrenze des VP_{Thr} in E.coli-Lysat-VP_{Thr}-Mischungen im DE.
Mikrotiterplatten wurden mit
a) VP_{Thr} und konstanter Konzentration parentalen E.coli-Lysat HB 101 (Verd. 1:10) und mit
b) konstanter Konzentration von VP_{Thr} (5 µg/ml) in Lysatverdünnungsstufen
beschichtet, und das VP_{Thr} mit enzymkonjugierten anti-VP_{Thr}-Antikörpern nachgewiesen. Die Extinktionen wurden nach 30 Minuten mit dem Multiskan-Photometer abgelesen.

E.coli-Klone	Reziproke E.coli-Lysat-Verdünnung					
	1. Aufzucht			3. Aufzucht		
	31.25	312.5	3125	12.5	125	1250
144	0.06	0.05	0.04	1.32	0.77	0.16
703	0.70	0.31	0.12	0.09	0.05	0.05
HB 101	0.07	0.03	–	0.07	0.03	–

VP_{Thr} (µg/ml)	5	0.5	0.05	0
DE (Ext.)	> 2	1.91	0.16	0.07

Tab. 12: Vergleich zweier E.coli-Aufzuchten im DE
Mikrotiterplatten wurden mit den in der Tabelle angegebenen Lysatverdünnungsstufen und zur Kontrolle mit VP_{Thr} (unten) bei pH 9,6 beschichtet, und anschließend mit enzymkonjugierten anti-MKSV-O_1K-Antikörpern inkubiert. Die Substratumsetzung wurde photometrisch verfolgt, und die Extinktionen nach 45 Minuten abgelesen.

Da bekannt ist, daß rekombinante Bakterien sich von ihrem Plasmid ohne erkennbaren Grund trennen können, ist das Ergebnis mit dem Klon 703 nicht verwunderlich. Daß jedoch Rekombinanten erst bei späteren Aufzuchten aktiv werden, erscheint unwahrscheinlich. Möglicherweise lag beim Klon 144 eine Änderung der internen Regulation zur Expression der inserierten MKSV-c-DNS vor.

5.2.3. Nachweis während unterschiedlichen Wachstumsphasen der E.coli-Plasmid-Rekombinanten

Einen Vergleich der Aktivitäten in Rekombinantenlysaten während der logarithmischen und der stationären Wachstumsphase der Bakterien zeigt Tab. 13. Verglichen wurden die

Klone 144, 703 und 715 nach der 3. Aufzucht. Dabei konnten keine unterschiedlichen Aktivitäten beobachtet werden. Die Lysate reagierten in beiden Phasen entweder positiv (Klone 144 und 715) oder negativ (Klon 703). Daß die viralen Aktivitäten in der logarithmischen Phase gelegentlich niedriger als in der stationären Phase lagen, steht in Einklang mit der Tatsache, daß zu diesem Zeitpunkt im allgemeinen weniger Fremdproteine exprimiert werden.

E.coli-Klone	Reziproke E.coli-Lysat-Verdünnung					
	logarithmische Phase			stationäre Phase		
	12.5	125	1250	12.5	125	1250
144	0.26	0.37	0.09	1.32	0.77	0.16
703	0.08	0.05	0.03	0.09	0.05	0.05
715	0.44	0.09	0.05	0.40	0.08	0.08
HB 101	n.t.	n.t.	n.t.	0.07	0.03	n.t.

VP_{Thr} (µg/ml)	5	0.5	0.05	0
DE (Ext.)	> 2	1.91	0.16	0.07

Tab. 13: Nachweis exprimierter viraler Genprodukte während unterschiedlicher Wachstumsphasen von E.coli-Plasmid-Rekombinanten
Beschichtung und weitere Behandlung der Mikrotiterplatten siehe Tab. 12.
n.t. = nicht getestet

5.2.4. Nachweis mit ELISA-Inhibitionstechniken

Die Inhibitionsergebnisse, die mit Lysaten aus E.coli-Rekombinanten im Sandwich-ELISA- und indirekten ELISA-Inhibitionstest (SE-I und IE-I) erhalten wurden, sind in Tab. 14 dargestellt. Alle aufgeführten Lysate reagierten im

Sandwich-ELISA mit anti-MKSV-O_1K-Antikörpern negativ, so daß die Anwendung der Hemmteste sinnvoll erschien.
Die Lysate der Klone 331 und 715 inhibierten anti-MKSV-O_1K- und anti-VP_{Thr}-Antikörper in beiden Testsystemen beträchtlich. Das Lysat des Klons 144 reduzierte die Aktivität von anti-MKSV-Antikörpern im SE-I und IE-I, überraschenderweise nicht jedoch von anti-VP_{Thr}-Antikörpern im SE-I. Die Lysate des Klons 703 und des parentalen Kontrollstamms HB 101 zeigten keine Reduktion der Antikörperaktivitäten in den Hemmversuchen.

E.coli-Klone	Reziproke E.coli-Lysat-Verd.		
	31.25[a)]	31.25[b)]	62.5[c)]
144	12.7	82.4	29.9
331	44.1	85.7	79.3
703	12.7	-29.3	22.7
715	37.8	95.6	64.1
HB 101	0.1	14.5	6.0

Tab. 14: Nachweis exprimierter viraler Genprodukte in Lysaten von E.coli-Plasmid-Rekombinanten mit ELISA-Inhibitionstechniken
Die Lysate der aufgeführten Klone wurden
a) im SE-I gegen anti-VP_{Thr}-Antikörper,
b) im SE-I gegen anti-MKSV-O_1K-Antikörper und
c) im IE-I gegen anti-MKSV-O_1K-Serum
getestet. Die Testprozeduren für die ELISA-Hemmtechniken sind in C.17.3., S. 34/35, beschrieben. Die Werte geben die prozentuale Inhibition der spezifischen antiviralen Antikörper wieder.

5.3. Serologischer Nachweis des VP_{Thr}-Fusionsproteins in Lysaten von E.coli-pPL VP1-Plasmid-Rekombinanten

Um gezielt die Expression des VP_{Thr} zu erhalten, wurde das Plasmid pPL VP1, wie in Abb. 14 dargestellt, konstruiert (KÜPPER et al., 1981). Hierfür kamen nur solche MKSV-c-DNS-Fragmente in Betracht, die mit dem kleinen Pst I - Hind III - Fragment des Klons 144 hybridisierten, und außerdem zusätzlich eine Bam HI - Schnittstelle besaßen (Abb. 11: Klone 1034 und 1448). Die inserierten DNS-Fragmente dieser Klone trugen demnach die gesamte genetische Information für das VP_{Thr}.
Die Insertion doppelsträngiger MKSV-c-DNS in das Plasmid pPLc 24 bot gegenüber dem Plasmid pBR 322 folgende wesentliche Vorteile:

1) Durch spezifische Verdauung des Donor-Plasmids pFMDV-1034 (= Klon 1034) und des Vektor-Plasmids pPLc 24 mit den Restriktionsendonucleasen Bam HI und Hind III wurde die richtige Orientierung der reinserierten MKSV-c-DNS in das Plasmid gewährleistet.
2) Das Leseraster der DNS-Insertion war zudem in Phase mit der genetischen Information des vorausgehenden Polymerasefragments des Bakteriophagens MS 2.
3) Der Vektor pPLc 24 trägt den starken linken Promotor des Bakteriophagens λ, wodurch eine erfolgreiche Expression des VP_{Thr} gewährleistet wird. In Wirtsstämmen, die einen Temperatur-sensitiven λ-Repressor synthetisieren können (DERYNCK et al., 1980), kann die Expression des VP_{Thr}-Fusionsproteins kontrolliert werden. Eine Temperaturerhöhung auf 42° C ermöglicht dann diese Expression.

Tab. 15 zeigt den serologischen Nachweis von exprimiertem VP_{Thr}-Fusionsprotein in Lysaten von E.coli-pPL VP1-Plasmid-Rekombinanten, welche durch Reinsertion des Hind III- und Bam HI-geschnittenen MKSV-c-DNS-Fragments des Klons 1034 erhalten wurden. Bis auf die Lysate der Klone 6-25, 39-54, 39-57, 48-68 und der parentalen Kontrollklone pPL 76 und

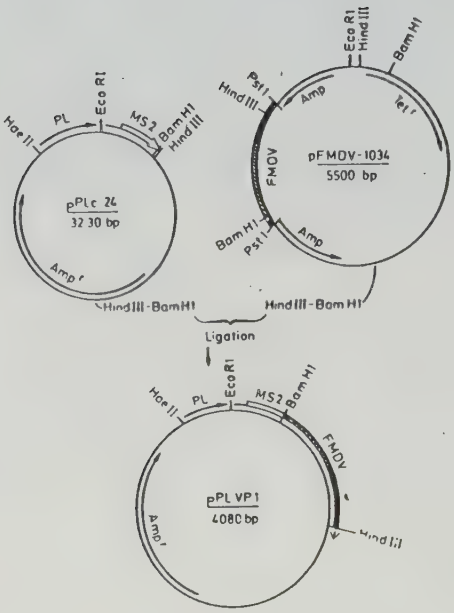


Abb. 14: Konstruktion des Plasmids pPL VP1 (KÜPPER et al., 1981)

pPL 80, die Plasmide ohne MKSV-DNS-Insertionen trugen, inhibierten alle übrigen Lysate ein spezifisches anti-VP_{Thr}-Antiserum im indirekten ELISA-Hemmtest teilweise beträchtlich. Das Vorhandensein von 5 µg/ml VP_{Thr} verursachte in diesem Versuch eine Hemmung des Serums von 78,7%. Die Werte der beiden anderen Strukturproteine sowie der beiden Kontroll-Lysate geben die Reaktion mit dem unspezifischen Proteinhintergrund wieder.

E.coli-Klone	E.coli-Lysat-Verdünnung ($-\log_{10}$)		
	1	2	3
1 - 03	67.4	33.5	4.4
1 - 07	28.4	7.8	16.4
2 - 12	81.7	54.8	26.8
2 - 18	82.1	43.4	19.7
6 - 21	72.3	35.0	10.5
6 - 25	7.8	7.9	11.6
7 - 32	77.2	43.2	19.5
7 - 40	68.3	29.7	5.0
14 - 43	38.8	6.7	9.2
14 - 46	54.1	8.6	12.5
39 - 54	2.5	1.9	-2.9
39 - 57	13.1	4.2	7.6
48 - 61	28.2	11.8	9.7
48 - 68	20.7	10.8	8.9
pPL 76	17.3	7.4	2.5
pPL 80	3.0	1.4	2.9

	Strukturproteine (5 µg/ml)		
	VP_{Thr}	VP_{Gly}	VP_{Asp}
Hemmung (%)	78.7	21.2	16.7

Tab. 15: Nachweis des VP_{Thr}-Fusionproteins in Lysaten von E.coli-pPL VP1-Plasmid-Rekombinanten im IE-I

Die Hemmung eines spezifischen anti-VP_{Thr}-Antiserums mit $\log_{10}$-Verdünnungsstufen der aufgeführten Lysate und zur Kontrolle mit konst. Konzentrationen der Hauptstrukturproteine (unten) wurde im IE-I bestimmt. Die Werte geben die prozentuale Hemmung des spezifischen Antiserums wieder.

5.4. Immunisierungsversuche mit ungereinigten Lysaten

Um zu prüfen, inwieweit die in den E.coli-Rekombinanten exprimierten viralen Genprodukte auch immunisierende Eigenschaften besitzen, wurden STU-Mäuse mit den entsprechenden Lysaten immunisiert. Diese wurden unter den gleichen Bedingungen wie für die Proteine und Peptide des MKSV appliziert. Dabei wurden maximal 0,05 ml reines Lysat/Maus und Injektion verabreicht. Limitierend für diese Menge war die Toxizität der Lysatkomponenten.
Alle Immunisierungsversuche blieben insofern erfolglos, als daß keine antiviralen Antikörper im Serum der Tiere nachgewiesen werden konnten. Dafür mag es, wie noch ausführlich diskutiert wird, mehrere Gründe geben. Es muß berücksichtigt werden, daß in den E.coli-Rekombinanten ein Fusionsprotein exprimiert wird, dessen Proteinfremdanteil die Konformation der Tertiärstruktur des viralen Anteils unter Umständen derart verändern kann, daß von dessen nativer Struktur nur wenig erhalten bleibt und dadurch keine antivirale Antikörperinduktion erfolgt. Auch erscheint die Immunisierung mit derartigen Proteingemischen, wie unter 4.4., S. 59, bereits gezeigt wurde, problematisch.

5.5. Immunologische Aktivität des VP_{Thr} in VP_{Thr}-E.coli-Lysat-Gemischen

In diesem Versuch sollte die immunologische Nachweisgrenze des VP_{Thr} ermittelt werden, wenn dieses in unterschiedlichen Konzentrationen mit dem Lysat des E.coli-Kontrollstamms HB 101 gemischt und Mäusen verabreicht wird. Die Menge an Lysat wurde so gewählt, daß das beigemischte VP_{Thr} serologisch noch gut nachweisbar war (Tab. 11), und bei der Immunisierung der STU-Mäuse keine toxischen Reaktionen auftraten.
Tab. 16 zeigt, daß bei 1 µg VP_{Thr}, das zu 25 µl Lysat gemischt wurde, keine antiviralen Antikörper mehr nachgewiesen werden konnten. Dagegen entwickelte 1 µg allein verabreichtes VP_{Thr}/Maus und Injektion eine deutlich

nachweisbare antivirale Antikörperantwort. Erst 10 µg VP_{Thr}/Maus und Injektion führten auch in der Lysatmischung zu einer starken humoralen Immunantwort. Hier lag das Verhältnis von VP_{Thr} zu den Lysatkomponenten offensichtlich günstig für eine immunologische Erkennung des Virusproteins in dieser Mischung. Damit wurden ähnliche Ergebnisse erhalten, wie sie für die Mischimmunisierungsversuche von VP_{Thr}-CNBr-Peptiden und Erythrozytenmembranfragmenten bereits vorlagen (Tab. 10).

VP_{Thr} µg/Maus u. Injektion	VP_{Thr} + Lysat	VP_{Thr} - Lysat
10	4.5	4.8
1	2.7	4.4
0	3.0	< 2.7

Tab. 16: Immunologische Aktivität des VP_{Thr} in VP_{Thr}-E.coli-Lysat-Gemischen

STU-Mäuse wurden mit Gemischen aus VP_{Thr} und E.coli-Lysat HB 101/pBR 322 mit KFA i.p. viermal in 10tägigen Intervallen immunisiert (+Lysat). Als Kontrolle erhielten die Mäuse VP_{Thr} ohne Lysat verabreicht (-Lysat). Die Tiere wurden nach 35 Tagen geblutet und die Antikörpertiter im indirekten ELISA bestimmt.

E. Diskussion

Die Maul- und Klauenseuche ist eine hochinfektiöse und sehr leicht übertragbare Viruskrankheit. Natürliche Wirte sind ca. 30 domestizierte und wildlebende Klauentiere, wobei Rinder, Schweine, Schafe und Ziegen als wirtschaftlich bedeutsame Nutztiere für den Menschen besonders gefährdete Tierbestände darstellen. Bis zum Jahr 1966 verursachte dieses Virus in der Bundesrepublik Deutschland erhebliche volkswirtschaftliche Verluste in der landwirtschaftlichen Tierhaltung. Seit dieser Zeit ist die Impfung mit inaktivierter MKSV-Vakzine obligatorisch vorgeschrieben (BÖHM et al., 1972).
Die Vakzinierung mit inaktiviertem Virus trägt einige Nachteile in sich, wie im Kapitel B., S. 4, dieser Arbeit ausgeführt wurde. Prinzipiell erscheint es sinnvoll, nur diejenigen Bestandteile eines pathogenen Keims für eine Vakzinierung zu verwenden, die für eine erfolgreiche Impfung notwendig und ausreichend sind. Eine derartige Minimalvakzine aus Virusproteinbestandteilen muß Epitope zur Induktion der antiviralen Immunantwort besitzen, die einen hinreichenden Immunitätsschutz gegenüber infektiösen Viruspartikeln gewährleistet, und sollte nicht infektiös oder pathogen sein. Damit ergeben sich wesentliche Vorteile:

1) Bei der humoralen Immunantwort werden keine Antikörper sowohl gegen für den Impfschutz irrelevante Virusdeterminanten, als auch gegen virusfremde Bestandteile gebildet, die unter Umständen die Vakzine kontaminieren. Unerwünschte Nebenreaktionen wie Allergien werden so verhindert.
2) Gereinigte virale Proteine und Peptide sind frei von Nukleinsäure und beinhalten somit kein Restinfektionsrisiko mehr. Während der Isolierung und Reinigung dürfen diese Proteine und Peptide jedoch nicht irreversibel denaturiert werden. Die Konformation virushomologer Epitope muß im isolierten Zustand identisch oder

der Tertiärstruktur im virusintegrierten Zustand zumindest sehr ähnlich sein. Nur solche Strukturen bieten auch die Voraussetzung für eine erfolgreiche Immunisierung gegen das Virus.

1. Festlegung der experimentellen Parameter

Bei löslichen Antigenen steht die Effektivität der Immunantwort in enger Beziehung zur Injektionsroute des Antigens und steigt im allgemeinen in der Reihenfolge intravenös < intramuskulär < subkutan < intraperitoneal < intradermal < intranodal an (HURN et al., 1980). So schnitten bei der Bestimmung der Immunisierungsroute für die Bromcyan-Peptide des VP_{Thr} die i.v. und i.m. im Vergleich zur s.c. und i.p. Applikation und zur Immunisierung in die Fußsohlen relativ schlecht ab. Nur letztere drei erbrachten auch hinreichend hohe neutralisierende Antikörpertiter (Tab. 3).

Die i.p. Immunisierung von STU-Mäusen mit VP_{Thr}-CNBr-Peptiden erreichte nach 4 aufeinanderfolgenden Injektionen ein Optimum an neutralisierenden Antikörpern (Abb. 5). Meerschweinchen zeigten zwar die gleiche Kinetik, entwickelten jedoch bei gleicher absoluter, i.m. verabreichter Antigenmenge einen niedrigeren Titer neutralisierender Antikörper. Auch die gleiche Antigendosis, i.m. verabreicht und auf das Körpergewicht der Meerschweinchen bezogen, erzielte keinen weiteren Anstieg des Antikörpertiters (Abb. 5; Tab. 2). Zwar erbrachte schon eine einmalige Injektion von 0,1 mg VP_{Thr}-CNBr-Peptiden in die Fußsohlen von Meerschweinchen befriedigende Ergebnisse (Tab. 2), doch wurden, wie unter D.1., S. 37 ff, näher erläutert wurde, für die vergleichenden Untersuchungen Mäuse immunisiert.

Die gelegentlichen Titerschwankungen gegen die Bromcyan-Peptide, die auch von BACHRACH et al. (1979) beobachtet worden waren, rührten wahrscheinlich von deren Lösungszustand her. So wurden starke immunogene Aktivitäten nur in

Detergenzien enthaltenden Puffersystemen bei vollständiger Lösung der VP_{Thr}-CNBr-Peptide erreicht.
Die Immunisierung mit infektiösem MKSV zeigte eine deutliche Dosisabhängigkeit, die mit dem indirekten ELISA verfolgt werden konnte (Abb. 6). Dadurch waren die Voraussetzungen gegeben, nach erfolgreicher Immunisierung einen empfindlichen Antikörpernachweis zu führen.

2. Immunogenität von Proteinen und Peptiden des MKSV

Um den strukturellen Bereich des MKSV-O_1K zu lokalisieren, der für die Induktion neutralisierender Antikörper verantwortlich ist, wurden zwei Testsysteme zur Prüfung der Immunogenität nach Immunisierung mit Virusbestandteilen herangezogen:

1) der Plaque-Neutralisationstest zur Bestimmung neutralisierender Antikörper und
2) der indirekte ELISA zur Beurteilung immunogener Proteine und Peptide. Da im ELISA alle Seren gegen natives Virus geprüft wurden, können mit diesem Test in gewisser Beziehung auch Aussagen über den molekularen Zustand der für die Immunisierungen verwendeten Proteinkomponenten getroffen werden. Es kann sicherlich nicht ausgeschlossen werden, daß bei der Beschichtung der Mikrotiterplatten das Virus teilweise zerfällt, jedoch wirken keine derart denaturierenden Bedingungen, wie während der Virusproteinaufarbeitung und der übrigen Reinigungsprozeduren.

Alle drei untersuchten Strukturproteine des MKSV-O_1K, nämlich VP_{Thr}, VP_{Asp} und VP_{Gly}, zeichneten sich durch ihr gutes Antikörperbildungsvermögen aus, das im ELISA gemessen wurde. Neutralisierende Antikörper wurden jedoch allein gegen VP_{Thr} gebildet (Tab. 5). Damit stellt das VP_{Thr} das für die immunologische Abwehr des MKSV wichtige Strukturprotein dar. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten überein (LAPORTE et al., 1973; BACHRACH et al., 1975, 1977, 1979; KAADEN et al., 1977).

Die Antikörpergewinnung gegen das vierte Strukturprotein VP_4 bereitet, vermutlich wegen seiner Schwerlöslichkeit, große Schwierigkeiten. MELOEN et al. (1979, 1980) konnten weder im Neutralisationstest noch in anderen serologischen Nachweissystemen wie RIA und ELISA Antikörper gegen dieses Virusprotein nachweisen.

Die Immunisierung von STU-Mäusen mit den nach Bromcyanspaltung des VP_{Thr} aufgetrennten Peptiden (Abb. 8a) führte zu unterschiedlichen ELISA-Titern (Tab. 5). Gegen das kleinste Bromcyanpeptid CB_4 konnten keine virushomologen Antikörper mehr nachgewiesen werden. Auf Grund des geringen Molekulargewichts von ca. 2100 d (Tab. 8) lag es größenordnungsmäßig an der Grenze der Erfaßbarkeit, um vom Immunsystem als Immunogen noch erkannt zu werden (HURN et al., 1980). Auch gegen das $VP_{Thr/T2}$ aus der tryptischen Spaltung des MKSV in situ konnten, trotz seines relativ hohen Molekulargewichts von ca. 5000 d (Tab. 8), keine viralen Antikörper ermittelt werden. Der Grund hierfür ist entweder in einer veränderten Konformation des Moleküls, oder in der Annahme, daß dieses Peptidstück verdeckt im VP_{Thr} vorliegt, zu suchen. Im ersten Fall stehen keine nativen, virushomologen Determinanten für die Immunisierung zur Verfügung. Im zweiten Fall jedoch würden antivirale Antikörper im ELISA nicht erkannt, da diese gegen verborgene, normalerweise unzugängliche Determinanten gerichtet wären. Es gibt deutliche Hinweise, wie unter E.3. und 4. diskutiert wird, die letztere Annahme wahrscheinlich erscheinen lassen. Die enzymatische Spaltung des MKSV in situ erfolgt nur an bestimmten, exponierten Positionen der Virionoberfläche, die dem Enzym spezifische Spaltstellen zur Verfügung stellen. Das T2 - Fragment enthält jedoch noch eine ganze Reihe trypsinspezifischer Spaltstellen (Abb. 16), die während der Verdauung in situ nicht angegriffen werden, weil sie für das Enzym nicht zugänglich sind.
Die geringere Immunogenität des CB_3 im Vergleich zum CB_2 beruht möglicherweise auf dem gleichen Effekt, wie er für

das $VP_{Thr/T2}$ beschrieben wurde. Unter dieser Annahme lägen beim CB_3 jedoch nur ein Teil viraler Determinanten verborgen vor.

Die Bromcyanspaltung des VP_{Thr} führte zu den 4 Peptiden CB_1, CB_2, CB_3 und CB_4 (Abb. 8a), und nicht, wie ursprünglich angenommen wurde, zu 5 Spaltstücken (KAADEN et al., 1977; ADAM et al., 1978). Eine Induktion neutralisierender Antikörper gegen diese Bromcyanpeptide gelang nur mit den Fraktionen CB_0, CB_1 und CB_2 (Tab. 5). Die Fraktion CB_0 war jedoch uneinheitlich und enthielt teilweise gespaltenes und ungespaltenes VP_{Thr}. Eine Verschleppung von CB_0-Proteinbestandteilen in die Fraktion CB_1 (Abb. 8a) konnte in zweierlei Hinsicht ausgeschlossen werden:

- Einerseits erwies sich CB_1 elektrophoretisch einheitlich. Es wanderte im SDS-Gel als einzige Proteinbande (Abb.8a).
- Andererseits induzierte CB_1 einen deutlich höheren neutralisierenden Antikörpertiter als CB_0 (Tab. 5).

Die Applikation des Bromcyanpeptids CB_1 erzielte mit 2.9 ($-\log_{10}$) den höchsten Titer neutralisierender Antikörper, gefolgt von CB_2 mit 2.1 ($-\log_{10}$) und von VP_{Thr} mit 2.0 ($-\log_{10}$). Ein Abfall der Immunogenität der Peptide im Vergleich zum VP_{Thr} konnte nicht beobachtet werden. Deswegen kann vermutet werden, daß die zur Bildung neutralisierender Antikörper immunkompetenten Epitope gänzlich auf den beiden Peptiden CB_1 und CB_2 lokalisiert sind.

Wurden STU-Mäuse mit jeweils gleichen Mengen Virus, VP_{Thr}-CNBr-Peptiden oder ungespaltenem VP_{Thr} immunisiert, so lagen die Titer neutralisierender Antikörper bei den beiden letzteren erheblich niedriger (Tab. 5 und 7). Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß das MKSV ein Molekulargewicht von $8{,}1 \times 10^6$ d besitzt. Dagegen wurden die wesentlich kleineren Peptide bzw. Proteine trägermolekülfrei nur mit komplettem Freund'schen Adjuvans verabreicht, so daß die Antikörpertiter aus oben genannten Gründen nicht unbedingt vergleichbar sein müssen.

Von den enzymatisch gespaltenen Fragmenten induzierte lediglich das $VP_{Thr/A2}$, das nach Arginin-spezifischer Verdauung des MKSV erhalten wurde, noch neutralisierende Antikörper (Tab. 7). Die beiden tryptischen Peptide dagegen zeigten, in Übereinstimmung mit BACHRACH et al. (1975), keine Bildung neutralisierender Antikörper. Spätere gegenteilige Befunde (BACHRACH et al., 1979) lassen sich mit einer unvollständigen tryptischen Verdauung des Virions erklären.

Weiterhin läßt sich die Immunogenität des MKSV nicht mit der des VP_{Thr} vergleichen, da das Virus stets in infektiösem Zustand den Versuchstieren verabreicht wurde. Eine Vermehrung von infektiösem MKSV in STU-Mäusen mit einer rasch abklingenden Virämie konnte nicht ausgeschlossen werden und würde höhere Titer neutralisierender Antikörper verursachen. Diese Virämie wurde schon in früheren Untersuchungen gezeigt, wobei bezüglich der Empfänglichkeit der erwachsenen Maus gegenüber dem MKSV Unterschiede sowohl hinsichtlich der eingesetzten Mäuseinzuchtstämme als auch der MKSV-Typen gefunden wurden (UHLMANN, 1958, 1960; SUBAK-SHARPE, 1961a, 1961b, 1961c; SUBAK-SHARPE et al., 1963).
BACHRACH et al. (1975) konnten jedoch zeigen, daß eine einmalige Inokulation von 10 µg Acetyläthylenimin inaktiviertem MKSV-A_{12}, einem Gehalt von ca. 2 µg VP_{Thr} entsprechend, Schweine besser gegen infektiöses Virus schützte, als 2 Injektionen zu je 100 µg VP_{Thr} des homologen Virus. Mit inaktiviertem Virus wurden auch höhere neutralisierende Antikörpertiter erreicht als mit VP_{Thr} allein (BACHRACH et al., 1975). Diese Befunde demonstrieren eindrucksvoll die Problematik der protektiven Immunisierung mit viralen Strukturuntereinheiten. Die Immunogenität des intakten Virus kann zur Erlangung des gleichen Immunitätsschutzes nur mit einer unverhältnismäßig großen Menge an Strukturprotein und mehrfachen Injektionen erreicht werden.

3. Enzymatische Spaltung des MKSV-O_1K

Die Spaltung des MKSV-O_1K in situ mit den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin, Thermolysin, der Arginin-spezifischen Protease aus der Submaxillarisdrüse der Maus und der Lysin-spezifischen Endoproteinase Lys-C führte zu jeweils zwei elektrophoretisch nachweisbaren Spaltprodukten des VP_{Thr} mit unterschiedlichen Molekulargewichten (Abb. 7; STROHMAIER et al., 1982). Die beiden größten Fragmente entstanden bei der Verdauung mit der Arginin-spezifischen Protease. Die V 8 - Protease aus Staphylococcus aureus war weder in Carbonat- noch in Phosphat-Puffer in der Lage, das Virion in situ zu spalten (Abb. 7). Daraus kann geschlossen werden, daß keine Glutamin- und Asparaginsäure zur Spaltung verfügbar waren. Die restlichen drei Strukturproteine VP_{Asp}, VP_{Gly} und VP_4 wurden von keinem der eingesetzten Enzyme angegriffen. Die Infektiösität des MKSV wurde nur durch Chymotrypsin und insbesondere durch Trypsin reduziert (Tab. 6).

Trypsin behandeltes MKSV zeigt im allgemeinen reduzierte Antigenität, Immunogenität und Infektiösität, letztere als Folge der verminderten Fähigkeit, an Rezeptoren MKSV empfänglicher Zellen zu binden (MATHEKA et al., 1962; BROWN et al., 1963a; WILD et al., 1967; ROWLANDS et al., 1971; STROBBE et al., 1974; CAVANAGH et al., 1977; COWAN et al., 1978). MOORE und COWAN (1978) berichten jedoch in ihren Untersuchungen über LP(large plaque)- und SP(small plaque)-Varianten des MKSV über eine antigene Resistenz der SP-Variante gegenüber Trypsin und Infektiösitätsresistenz gegenüber Chymotrypsin. Die LP-MKSV-Varianten waren sowohl Trypsin- als auch Chymotrypsin-sensitiv. BARTELING et al. (1979) isolierte eine Trypsin-resistente MKSV-O_1-Variante, die trotz Trypsinspaltung des Virions in situ infektiös blieb, keine verminderte Zelladsorption zeigte, und sich vom VP_{Thr} des parentalen MKSV-Typs durch ein 3000 d größeres VP_{Thr} unterschied. Die Restinfektiösität unserer Versuche (Tab. 6) kann ebenfalls mit einer derartigen Popu-

lation Trypsin-resistenter Viruspartikel erklärt werden.

Trypsin hydrolysiert nur eines der 4 Strukturproteine (WILD et al., 1969; STROHMAIER et al., 1974), nämlich das VP_{Thr}, das auch die Bildung neutralisierender Antikörper stimuliert (LAPORTE et al., 1973; BACHRACH et al., 1975). Untersuchungen der Oberflächenstruktur des MKSV und der Nachbarschaftsbeziehungen der Strukturproteine untereinander weisen darauf hin, daß das VP_{Thr} besonders an der Virionoberfläche exponiert ist (BROWN et al., 1970; MOORE et al., 1978; BARTELING et al., 1979). Auffallende Ähnlichkeiten, was die besondere Oberflächenexposition des VP_{Thr} angeht, finden sich auch bei den dem VP_{Thr} analogen Virusproteinen der übrigen Picornaviren, wie beim Poliovirus (BENEKE et al., 1977; WETZ et al., 1979), beim Mengovirus (LUND et al., 1977), beim humanen Rhinovirus (LONBERG-HOLM et al., 1976) und beim bovinen Enterovirus (CARTHEW et al., 1974).

Die Analyse und Charakterisierung der Bromcyanfragmente des VP_{Thr} sowie der beiden tryptischen Spaltpeptide T1 und T2 (Abb. 8 und Tab. 8) beweisen den Verlust größerer Peptidfragmente nach der tryptischen Verdauung des Virions in situ (D.3.2.). Hinweise von WILD und BROWN (1967), die nach Gradientenzentrifugation von radioaktiv markiertem, Trypsin-gespaltenem MKSV am Meniskus des Gradienten einen geringen Radioaktivitätspeak ermittelten, und von BROWN und SMALE (1970), die in Virus-Antikörper-Bindungsstudien den Verlust viraler Determinanten nach Trypsinverdauung feststellten, bestätigen dieses Ergebnis.
Wurde das MKSV dagegen mit der Arginin-spezifischen Protease gespalten, so trat kein Infektiösitätsverlust auf, und auch die Immunogenität der isolierten Fragmente A1 und A2 blieb im Vergleich zum VP_{Thr} nahezu vollständig erhalten (Tab. 6 und 7). Die Konservierung bestimmter Viruseigenschaften wie Infektiösität, Antigenität und Immunogenität von enzymatisch behandeltem MKSV hängt

offensichtlich von an der Virionoberfläche exponierten, für das jeweilige Enzym leicht zugänglichen Schnittstellen, und damit entscheidend von der Anzahl freigesetzten Aminosäuren bzw. Peptidfragmenten ab. Die Trypsin-verdauten Fragmente, die aus dem im Virion integrierten VP_{Thr} geschnitten wurden, sind somit auch für die reduzierte Immunogenität und die fehlende neutralisierende Antikörperbildung verantwortlich.

4. Lokalisierung immunkompetenter Bereiche des VP_{Thr}

Zur Lokalisierung immunkompetenter Bereiche des VP_{Thr} wurden

1) die terminalen Aminosäuren und Molekulargewichte der chemisch und enzymatisch gespaltenen Peptide bestimmt (Tab. 8),

2) überlappende Bromcyanpeptide des VP_{Thr} und der tryptischen Spaltstücke T1 und T2 des VP_{Thr} miteinander verglichen (Abb. 8) und schließlich

3) die Spaltpeptide in Immunisierungsversuchen auf ihre Immunogenität hin geprüft (Tab. 5 und 7).

Insbesondere sollten damit die zur Virusneutralisation nötigen immunogenen Bereiche des VP_{Thr} ermittelt werden. Abb. 15 zeigt eine Zusammenfassung dieser Daten (FRANZE et al., 1981; STROHMAIER et al., 1982).
In der ersten oberen Reihe ist das VP_{Thr}-Strukturprotein mit den Bromcyanspaltstellen (CNBr), sowie den Schnittstellen für Trypsin und die Arginin-spezifische Protease aus der Submaxillarisdrüse der Maus dargestellt. Die Säurebruchstelle zwischen Asparaginsäure und Prolin ist ebenfalls markiert ($H^{\oplus}$).
Die zweite Reihe zeigt die Bromcyanpeptide; CB_1 und CB_2 sind besonders hervorgehoben, da sie allein neutralisierende Antikörper zu induzieren vermögen.
In Reihe 3 sind die beiden tryptischen Peptide T1 und T2 des VP_{Thr} mit den entsprechenden Bromcyanspaltstücken $T1_{1-3}$ und $T2_{1,2}$ aufgeführt. An Hand der Bromcyanspalt -

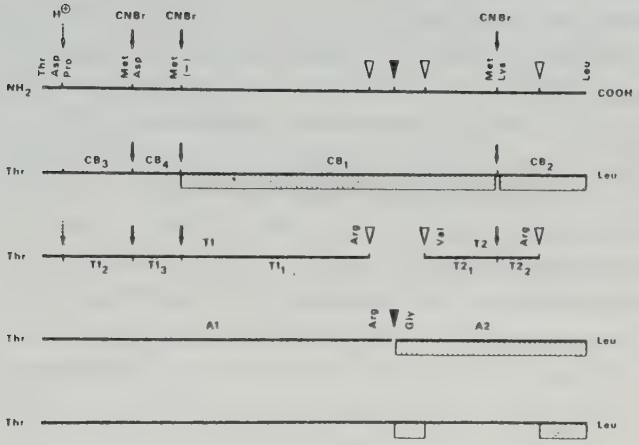


Abb. 15: Lokalisierung immunkompetenter Bereiche im Strukturprotein VP_{Thr}, die Virus-neutralisierende Antikörper induzieren.
Die Längen der Peptide entsprechen den Molekulargewichten. Bereiche, die Virus-neutralisierende Antikörper induzieren, sind markiert (▨). Weitere Erläuterungen siehe Text.

▽ Trypsinspaltstelle
▼ Arginin-spezifische Spaltstelle

stellen, der terminalen Aminosäuren und der Molekulargewichte konnten die beiden tryptischen Peptide im VP_{Thr}-Strukturprotein lokalisiert werden. Wie unter D.3.2. ausgeführt wurde, ergab die Summe der Molekulargewichte der tryptischen Fragmente T1 und T2 eine deutliche Differenz von ca. 4500 d im Vergleich zum Molekulargewicht des VP_{Thr}. Die fehlenden Aminosäuresequenzen (in der Abb. 15 durch Lücken dargestellt) bei beiden Peptiden erklären den teilweisen Verlust der Immunogenität und deren Unfähigkeit, neutralisierende Antikörper bilden zu können.
Die enzymatische Verdauung mit der Arginin-spezifischen Protease führte zu 2 immunogenen Peptiden (A1, A2), wobei nur A2 zur Bildung neutralisierender Antikörper fähig war (Abb. 15, Reihe 4). A2 enthält die gesamte Sequenz des Bromcyanpeptids CB_2; daraus folgt, daß der C-terminale Bereich des VP_{Thr} Epitope trägt, welche die Bildung neutralisierender Antikörper stimulieren. Der Titer an neutralisierenden Antikörpern gegen A2 war mit 1:28 jedoch niedriger als derjenige gegen das komplette VP_{Thr} (1:100, Tab. 7). Dies könnte bedeuten, daß der zur Induktion neutralisierender Antikörper notwendige Bereich über das A2 ein kleines Stück in das CB_1-Fragment reicht, und somit von der Arginin-spezifischen Protease abgeschnitten wird. Auch kann die molekulare Stabilität des A2 nur schlecht abgeschätzt werden, so daß eine Denaturierung nativer Virusdeterminanten nicht ausgeschlossen werden kann.
In der letzten Reihe sind die Bereiche des letzten Drittels des VP_{Thr} hervorgehoben, die zur Bildung virusneutralisierender Antikörper entscheidend sind. Die Aufklärung der Nukleinsäure- und der entsprechenden Aminosäuresequenz des VP_{Thr} (KURZ et al., 1981) ermöglichte eine engere Eingrenzung dieser Bereiche (Abb. 16). Die Regionen zwischen den Aminosäurepositionen $Glycin^{146}$ bis $Lysin^{154}$ sowie die C-terminale Sequenz $Histidin^{201}$- $Leucin^{213}$ stellen die einzigen Bereiche im 213 Aminosäuren umfassenden VP_{Thr} dar, die von Peptiden überlappt werden, welche neutralisierende Antikörper induzieren können. Diese Sequen-

zen liegen in den Bromcyanpeptiden CB_1 und CB_2 und werden von den tryptischen Spaltstücken T1 und T2 begrenzt (STROHMAIER et al., 1982).

Das unterschiedliche Schnittverhalten von Trypsin und der Arginin-spezifischen Protease läßt sich mit Kenntnis der Aminosäuresequenz des VP_{Thr} ebenfalls erklären. Trypsin, mit der Spezifität für Lysin und Arginin, spaltet schrittweise die Aminosäuresequenz hinter $Lysin^{154}$, $Arginin^{145}$ und $Arginin^{138}$ sowie hinter $Lysin^{210}$, $Lysin^{204}$, $Lysin^{202}$ und ermöglicht sich damit den Zugang zur Aminosäureposition $Arginin^{200}$. Für die Arginin-spezifische Protease ist offensichtlich nur der Bereich um die Aminosäureposition $Arginin^{145}$ zugänglich, wobei eine sterische Hinderung der Positionen $Arginin^{138}$ und $Arginin^{200}$ für einen Angriff dieses Enzyms angenommen werden muß (Abb. 16; STROHMAIER et al., 1982).

Die protektive Immunisierung mit viralen Strukturproteinuntereinheiten gelingt außer beim MKSV noch beim Virus der Bläschenkrankheit des Schweins, beim Schweinepestvirus, beim Influenza- und Masernvirus, beim Tollwut- und Friend-Leukämie-Virus, beim Hepatitis-B- und Putenherpesvirus, dessen Proteine auch Immunitätsschutz gegen das Virus der Marek'schen Krankheit verleihen, und bei Adenoviren. Eine Übersicht der viralen Proteinuntereinheiten, die als Vakzine gegen die genannten Viren dienen können, geben BACHRACH et al. (1978).

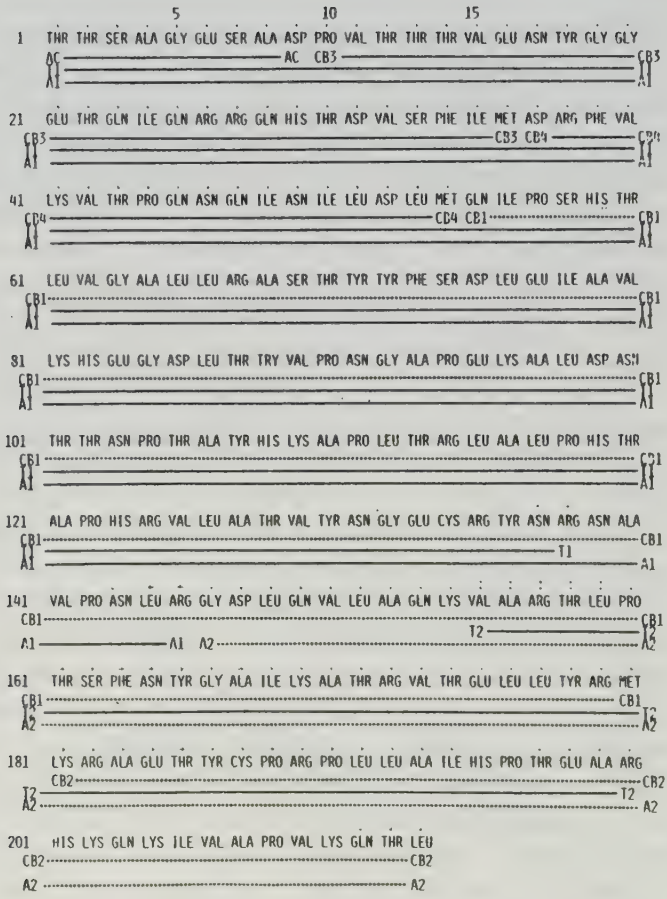


Abb. 16: Aminosäuresequenz des VP_{Thr} (KURZ et al., 1981)
Peptide, die neutralisierende Antikörper induzieren können, sind punktiert, die übrigen liniert dargestellt. Pfeile markieren Sequenzen, deren Aminosäuren proteinchemisch bestimmt worden waren (STROHMAIER et al., 1978b; 1982 und unveröffentliche Ergebnisse).

5. Versuche zur Verstärkung der humoralen Immunantwort gegen die VP_{Thr}-CNBr-Peptide

VP_{Thr}-CNBr-Peptide wurden in molarem Unter- und Überschuß in ein- und zweistufigen Kupplungsreaktionen kovalent an hochmolekulare Trägerproteine gekuppelt (Tab. 9). Bei der Kupplung an KLH mit Glutardialdehyd und DFDNB wurde ein mindestens 4fach molarer Überschuß der Peptide eingesetzt. KLH wurde als Carriermolekül gewählt, da dessen hochimmunogene Wirksamkeit bekannt ist (RITTENBERG et al., 1966). DFDNB-aktivierte Peptide wurden in molaren Hapten-Carrier-Verhältnissen von 1:3,5 und 1:35 an HSA bzw. von 4:1 und 0,4:1 an KLH in einer Zweistufenreaktion gekuppelt.
Die gezielte Kupplung der Peptide über bestimmte Aminosäureseitenketten war nicht durchführbar, da derzeit die genaue Aminosäuresequenz der Peptide nicht bekannt war. Obgleich die Kupplungsfähigkeit der Peptide autoradiographisch nachgewiesen werden konnte, war keiner der VP_{Thr}-CNBr-Peptid-Carrierkomplexe in der Lage, weder eine verstärkte humorale Immunantwort gegen die Peptide zu induzieren, noch das Antikörperbildungsvermögen der isoliert verabreichten Bromcyanpeptide zu erreichen. Dagegen konnten gegen den jeweiligen Trägermolekülanteil und gegen die VP_{Thr}-CNBr-Peptide selbst sehr gute Antikörperantworten erhalten werden.

Es stellt sich nun die Frage, womit die fehlende Bildung antiviraler Antikörper nach Verabreichung der Peptidkomplexe begründet ist. Zur erfolgreichen Kupplung der Peptide an Trägermoleküle mit den entsprechenden Kupplungsreagentien sind bestimmte, funktionelle Seitengruppen erforderlich.
Die Vernetzung mit Glutardialdehyd erfordert frei verfügbare und zugängliche Aminogruppen , und verläuft sicherlich nicht über einfache α,ω-bis-Schiff'sche Basen-Proteinverbindungen (RICHARDS et al., 1968; REICHLIN, 1980). Die Kupplung mit DFDNB erfordert freie Amino-, Histidyl- und Tyrosylgruppierungen (LIKHITE et al., 1967; WOLD, 1972).

Carbodiimide schließlich stellen multifunktionelle Kupplungsreagenzien dar, die funktionelle Carboxyl-, Amino-, Phosphat-, Alkohol- und Thioalkoholgruppen mit Amino-, Estergruppierungen etc. verknüpfen können (GOODFRIEND et al., 1964). Bei der Reaktion mit Carbodiimiden, die zu einer Peptidbindung führen soll, wird zunächst mit freien Carboxylgruppen des Peptids ein Intermediat gebildet, das entweder über ein Carbonsäureanhydrid die gewünschte Peptidbindung, oder aber, als unerwünschtes Nebenprodukt, ein Protein-substituiertes N-Acylharnstoffderivat zu bilden vermag (LIKHITE et al., 1967; BAUMINGER et al., 1980; ERLANGER, 1980).
Die Bromcyanpeptide stellen eine Vielzahl der genannten funktionellen Gruppen zur Verfügung, wie z. B. vier ε-Aminogruppen des Lysins, ein Histidin- und ein Asparaginsäurerest allein in den zur Bildung virusneutralisierender Antikörper verantwortlichen Bereichen (Abb. 16). Somit könnte die fehlende Antikörperinduktion darauf zurückgeführt werden, daß bei der Kupplung von VP_{Thr}-CNBr-Peptiden mit gängigen Kupplungsreagenzien an Trägerproteine native, immunogene Determinanten maskiert und denaturiert werden. Auch BACHRACH et al. (1979) erhielten keine Bildung neutralisierender Antikörper, wenn sie das VP_{Thr} ($MKSV\text{-}A_{12}$) mittels Glutardialdehyd an Rinder-IgG kuppelten, oder die VP_{Thr}-CNBr-Peptide untereinander mit Glutardialdehyd vernetzten.

Weiterhin muß bei der Beurteilung der genannten Ergebnisse bedacht werden, daß es sich bei den VP_{Thr}-CNBr-Peptiden um relativ große Moleküle mit zahlreichen funktionellen Gruppen handelt. Dagegen sind kurzkettige Peptide bereits mehrfach mit Erfolg an Trägerproteine kovalent gebunden und zur Immunisierung verwendet worden (BENJAMINI et al., 1972; INMAN et al., 1973; LÜBKE et al., 1978). So verknüpfte ANDERER (1963, 1965) C-terminale Aminosäuresequenzen (Tri- bis Hexapeptide) des Tabakmosaikvirus (TMV) mit Rinderserumalbumin, und erhielt gegen diese Peptidkonjugate Anti-

seren, die eine TMV-Infektion zum Teil genauso effektiv zu hemmen vermochten, wie ein anti-TMV-Antiserum. Die Verknüpfung dieser Peptide verlief dabei über nur eine nötige α-Aminogruppe relativ einfach.

Besondere Beachtung verdient eine Arbeit von ARNON et al. (1980), die ein vollständig künstliches Antigen mit integrierter Adjuvanskomponente ("built-in adjuvanticity") synthetisierten. Ein 20 Aminosäuren langes Fragment des Bakteriophagens MS-2 wurde hierbei mit dem synthetischen Polypeptid poly(DL-Alanyl)-poly(L-lysin) und der minimalen Adjuvansstruktur von Mycobakterium des kompletten Freund'-schen Adjuvans (N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin) verknüpft. Antikörper gegen diesen Komplex neutralisierten den Bakteriophagen nahezu genauso gut, wie ein Antiserum, das gegen ein Gemisch aus mit poly(DL-Alanyl)-poly-(L-lysin) konjugiertem MS-2-Fragment in komplettem Freund'-schen Adjuvans gewonnen wurde.
So erscheint die Gewinnung neutralisierender Seren nach dieser Konzeption realisierbar, sobald die Nukleinsäuresequenz des VP_{Thr} aufgeklärt ist, und die für die Virusneutralisation entscheidenden Regionen lokalisiert sind.

6. Nachweis exprimierter viraler Genprodukte in Lysaten von Escherichia coli - Plasmid - Rekombinanten

Der serologische Nachweis der Expression viraler Genabschnitte in E.coli-Lysaten erforderte zunächst die Optimierung der ELISA-Standard- und Inhibitionstechniken. Beim Vergleich der Empfindlichkeiten der 3 ELISA-Standardvarianten erwies sich der Sandwich-ELISA (SE) als empfindlichster, und der direkte ELISA (DE) als unempfindlichster Test (Abb. 12). Die relative Unempfindlichkeit des DE war weitgehend unabhängig von der verwendeten Konjugatkonzentration (Abb. 13). Mit einem Nachweisbereich von 5-500 ng/ml MKSV-O_1K stehen diese Ergebnisse mit Befunden von CROWTHER et al.(1979b) und ABU-EL ZEIN et al. (1979) in Einklang.

In Rekonstitutionsexperimenten wurde die Erfassungsgrenze des VP_{Thr} in VP_{Thr}-Lysatgemischen bestimmt (Tab. 11). Sowohl die Ausverdünnung des VP_{Thr} bei konstanter Lysatkonzentration, als auch die Variation des parentalen Lysats bei konstanter VP_{Thr}-Konzentration, führte zu dem Ergebnis, daß selbst im DE 5 µg/ml VP_{Thr} im 1:10 verdünntem E.coli-Lysat noch eindeutig erfaßt werden konnten.

Nicht alle ELISA-Varianten eignen sich gleichermaßen gut zur serologischen Ermittlung viraler Genprodukte in E.coli-Lysaten. Für den direkten Nachweis wurde bevorzugt der DE eingesetzt, da mit ihm auch die Rekonstitutionsexperimente durchgeführt worden waren.
Bei den ELISA-Inhibitionstechniken kam der indirekte ELISA-Hemmtest (IE-I) vorrangig zur Anwendung, denn er bot gegenüber den direkten ELISA-Hemmtest (DE-I) und dem Sandwich-ELISA-Hemmtest (SE-I) einige wesentliche Vorteile:

1) Die hohe Ausverdünnung des zu hemmenden positiven Antiserums ($1:10^4$) vermied vorweg unerwünschte unspezifische Reaktionen nicht viraler Antikörper.

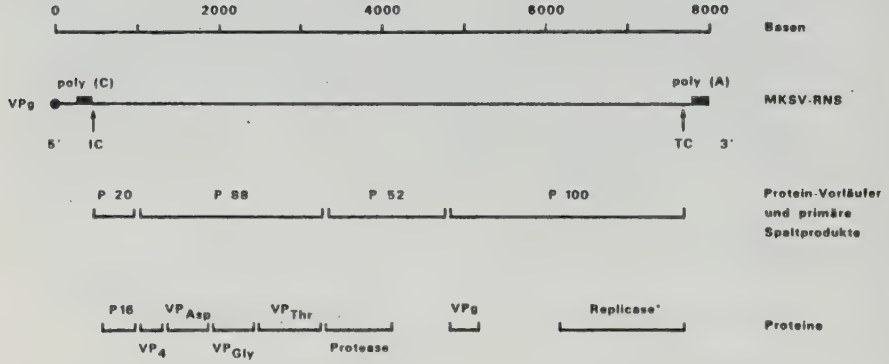
2) Jede, auch nur eine einzige Determinante des viralen

Genprodukts in den Lysaten konnte erfaßt werden, vorausgesetzt, daß ein Antikörper entsprechender Spezifität vorhanden war.

Der SE-I kann nur dann sinnvoll eingesetzt werden, wenn das gesuchte Protein theoretisch nur eine oder zumindest nur sehr wenige virale Determinanten für die Inhibitionsreaktion zur Verfügung stellt (Abb. 4). Dieser Test ist für den Nachweis multivalenter Lysatkomponenten ungeeignet, da trotz des Vorhandenseins nachweisbarer, positiver Lysatkomponenten ein negatives Ergebnis vorgetäuscht würde. Der DE-I erwies sich ebenfalls praktikabel, doch wurde ihm der IE-I wegen seiner größeren Vielseitigkeit vorgezogen.

6.1. Lysate von E.coli-pBR 322-Plasmid-Rekombinanten

Die Konstruktion dieser Rekombinanten ließ nur eine 16,7%ige Wahrscheinlichkeit an Klonen zu, deren MKSV-c-DNS-Insertionen in den Bakterien auch exprimiert werden können, denn weder das richtige Leseraster noch die richtige Orientierung der c-DNS-Fragmente im Plasmid waren gewährleistet. Die ersten Ergebnisse zeigten, daß 3 der 4 untersuchten Klone positiv reagierten (Tab. 14). Durch die Charakterisierung der c-DNS-Fragmente war bekannt, daß die Klone 144 und 715 den VP_{Thr}- und den Proteasebereich, und der Klon 331 zumindest den Replikasebereich des MKSV-Genoms trugen (Abb. 11 und 17). Der Klon 331 hatte ursprünglich 2 Plasmide mit unterschiedlich langen c-DNS-Insertionen. Während späterer Aufzuchten wurde jedoch nur das kurze Fragment auf Grund unbekannter Selektionsvorteile beibehalten, und das längere eliminiert. Im Klon 703 schließlich lag das MKSV-c-DNS-Fragment in der falschen Orientierung vor. Die Daten der Charakterisierung und Lokalisierung klonierter c-DNS-Fragmente bezüglich ihrer Expression waren bei den ersten E.coli-Aufzuchten nur teilweise, bei den späteren Aufzuchten vollständig mit den serologischen Ergebnissen im Einklang.



* = Komponente der RNS abhängigen RNS Polymerase

IC = Initiation-Codon TC = Termination-Codon

Proteine mit unbekannter Lokalisierung:
Inhibitoren der DNS abhängigen RNS- und Wirtsprotein-Synthese, Lysisfaktor

Abb. 17: Genomstruktur des Maul- und Klauenseuche Virus
Die Darstellung der Genomstruktur des MKSV folgt dem Übersichtsartikel von SANGAR (1979). Das VP_g wurde in Anlehnung an KITAMURA et al. (1980) und PALLANSCH et al. (1980) eingesetzt.

So konnten bei der dritten E.coli-Aufzucht in den Lysaten der Klone 144 und 715 eindeutig Genprodukte viraler Herkunft nachgewiesen werden (Tab. 13). Nach anfänglicher, ungeklärter positiver Reaktion des Klons 703, zeigte dieser Klon später erwartungsgemäß, ebenso wie der parentale Kontrollklon HB 101, der keine Insertion trug, keine Reaktion (Tab. 12 und 13). Auch die unterschiedlichen Inhibitionswerte der Lysate (Tab. 14) lassen sich nur spekulativ diskutieren. So waren bei allen ELISA-Inhibitionstests die Reaktionen derjenigen Klone am höchsten, die auch die längsten c-DNS-Insertionen enthielten.
Weiterhin muß die möglicherweise veränderte Tertiärstruktur dieser viralen Genprodukte, die nicht isoliert, sondern als Fusionsproteine exprimiert werden, für die Erkennung in den serologischen Tests berücksichtigt werden.
Mit dem DE konnte gezeigt werden, daß die Bakterienkulturen sinnvollerweise in der stationären Phase geerntet werden müssen. In dieser Phase lag die Expression viraler Genprodukte deutlich höher, als in der logarithmischen Wachstumsphase (Tab. 13)..
Hinsichtlich qualitativer Aussagen stimmten die Ergebnisse der ELISA-Tests stets mit den parallel am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführten RIAs überein.

6.2. Lysate von E.coli-pPL VP1-Plasmid-Rekombinanten

Die Vorteile dieser Rekombinanten (richtige Orientierung der c-DNS-Fragmente, Leseraster in Phase, genetische Kontrolle der Expression) wurden ausführlich unter D.5.3. dargelegt. Erwartungsgemäß reagierten die Lysate der meisten Klone positiv im IE-I mit anti-VP_{Thr}-Serum (Tab. 15), da sie alle das Bam HI - Hind III - MKSV-c-DNS-Fragment des Klons 1034 trugen (Abb. 11).
Insgesamt wurde ein Fusionsprotein mit 396 Aminosäuren, entsprechend einem Molekulargewicht von 40000-45000 d, exprimiert (KÜPPER et al., 1981). Es setzt sich im einzelnen aus einem Teil der MS-2-Polymerase, dem MKSV -

Strukturprotein VP_{Thr}, einem zusätzlichen MKSV-Anteil, und einem Peptidstück des Vektor-Plasmids pPLc 24 zusammen.
Die Inhibitionswerte im IE-I lassen eine quantitative Abschätzung der exprimierten VP_{Thr}-Fusionsproteinmoleküle pro Bakterium zu. In Tab. 15 inhibierten 5 µg/ml VP_{Thr} das anti-VP_{Thr}-Serum zu 78,7%. Ähnlich hohe Inhibitionen dieses Serums verursachten die 1:10 verdünnten Lysate der Klone 1-03, 2-12, 2-18, 6-21, 7-32 und 7-40. Aus 10^{11} E.coli-Bakterien wurde etwa 1 ml Lysat gewonnen, so daß im IE-I 5×10^{-16} g VP_{Thr}-Äquivalente/Zelle, entsprechend etwa 10^4 Moleküle/Bakterium nachgewiesen wurden. KÜPPER et al. (1981) errechneten aus autoradiographischen Daten, daß mindestens 10^3 Moleküle/Bakterium synthetisiert wurden. Auf Grund dieser quantitativen Abschätzung war zu prüfen, ob nach Verabreichung ungereinigten Lysats die zu erwartende Menge an VP_{Thr}-Fusionsprotein ausreichen würde, antiviral wirksame Antikörper zu induzieren.

6.3. Immunisierungsversuche mit Lysaten

Die Immunisierung von STU-Mäusen mit obengenannten ungereinigten Lysaten war hinsichtlich der Bildung von antiviralen Antikörpern erfolglos (vgl. D.5.4.). Als Ursache hierfür dürfte in erster Linie der Verlust der Immunogenität des VP_{Thr}-Fusionsproteins in der Mischung mit anderen Lysatkomponenten zu suchen sein. In Immunisierungsversuchen mit Gemischen aus VP_{Thr}-CNBr-Peptiden und Erythrozytenmembranfragmenten konnte gezeigt werden, daß 1 µg der Peptide in der Mischung in der STU-Maus immunologisch nicht mehr erkannt werden (Tab. 10). Ein vermuteter, die Antikörperantwort gegen diese Peptide verstärkender Adjuvanseffekt der Membranfragmente trat nicht ein. Neutralisierende Antikörper konnten auch bei der 10fach verabreichten Menge an Bromcyanpeptiden in der Mischung nicht mehr induziert werden (Tab. 10). Dieser Versuch wurde mit nahezu gleichem Ergebnis mit Gemischen aus VP_{Thr}

und E.coli-Lysat HB 101 wiederholt (Tab. 16).
Eine einfache Abschätzung zeigt, daß 25-50 µl serologisch positives Lysat (z. B. vom Klon 7-32) 1,25-2,5 µg VP_{Thr} - Äquivalente enthalten. Diese Menge konnte in rekonstitu - ierten VP_{Thr}-Lysaten eindeutig nachgewiesen werden (Tab. 11). Immunologisch liegt sie jedoch, wie in den Mischimmunisierungsversuchen gezeigt werden konnte, an der Erfassungsgrenze (Tab. 16).
Die fehlende antivirale Antikörperinduktion könnte weiterhin in einer veränderten Tertiärstruktur des viralen Fusionsproteinanteils im Vergleich zur nativen Struktur des VP_{Thr} begründet sein. Dagegen spricht jedoch, daß partiell gereinigtes VP_{Thr}-Fusionsprotein in Ziegen virusneutralisierende Antikörper induzierte. Die immunisierten Ziegen entwickelten im Gegensatz zu den Kontrolltieren im Belastungstest mit infektiösem MKSV keine oder nur eine schwache Virämie, was einen Immunitätsschutz gegen das Virus anzeigt (HOFSCHNEIDER et al., 1981).
Als dritte Möglichkeit wäre auch eine genetisch determinierte, suppressive Regulation der humoralen Immunantwort gegen das Fusionsprotein in STU-Mäusen in Frage gekommen. So untersuchten SERCARZ und Mitarbeiter (SERCARZ et al., 1978; ADORINI et al., 1979a, 1979b; MAIZELS et al., 1980a, 1980b; HARVEY et al., 1979) die murine Immunantwort gegen Hühnereilysozym und fanden, daß das Ausbleiben der Antikörperantwort mit IR-Genen des H-2-Komplexes bestimmter Inzuchtmäuse gekoppelt ist. Dieser Mäuseinzuchtstamm entwickelte gegen eine begrenzte Region des Lysozyms Suppressor-T-Zellen, welche die Antikörperantwort der B-Lymphozyten gegen das Protein unterdrückten. Die Abspaltung dieses Suppressorzellen induzierenden Bereichs wiederum ermöglichte auch in diesem Mäusestamm die Antikörperbildung gegen das Lysozym.
Meerschweinchen, die ebenfalls mit ungereinigten Lysaten immunisiert worden waren, entwickelten auch keine antiviralen Antikörper (MUSSGAY, unveröffentliche Ergebnisse). Dies konnte als Hinweis gewertet werden, daß eine gene -

tisch bedingte Suppression der Antikörperbildung gegen den viralen Anteil des Fusionsproteins wahrscheinlich nicht in Betracht kam.

7. Schlußbetrachtung

Die Fortschritte in der Gentechnologie der letzten fünf Jahre ermöglichten die Synthese einiger biologisch bedeutsamer Proteine in Prokaryonten. Marksteine dieser Entwicklung waren die prokaryontische Biosynthese der Hormone Somatostatin (ITAKURA et al., 1977) und Insulin (GOEDDEL et al., 1979), des Influenza-Haemagglutinins (EMTAGE et al., 1980), des humanen Fibroblasteninterferons (DERYNCK et al., 1980) und des humanen Leukozyteninterferons (NAGATA et al., 1980; GOEDDEL et al., 1980), des Hepatitis - B - Virusoberflächenantigens (CHARNAY et al., 1980) und des Strukturproteins VP_{Thr} des MKSV (KÜPPER et al., 1981, HARDY et al., 1981).

Weltweit ist kaum eine Vakzine in größerem Maßstab produziert worden, als diejenige gegen MKS (BROOKSBY, 1981). Die herkömmliche MKSV-Vakzine trägt, wie jeder Impfstoff, der aus inaktiviertem Virus hergestellt wird, die Gefahr von Impfzwischenfällen in sich. Unvollständige Inaktivierung oder Kontamination mit infektiösem Virusmaterial sind bis heute die Ursache von Ausbrüchen dieser Seuche (KING et al., 1981).

Die Kartierung immunkompetenter Bereiche des VP_{Thr} und die Synthese dieses Proteins in E.coli sind richtungsweisend für die Herstellung einer MKSV-Vakzine, die nur die für den Immunitätsschutz notwendigen Viruskomponenten enthält. Unter Berücksichtigung der Typen und Subtypen des MKSV ließe sich damit ein Impfstoff entwickeln, der die Risiken der herkömmlichen, inaktivierten Vakzine, wie Restinfektiösität und Immunogenitätsverlust, gänzlich ausschließt.

F. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die immunologisch wirksamen Epitope des Strukturproteins VP_{Thr} des Maul- und Klauenseuche-Virus (MKSV), Subtyp O_1K, näher zu charakterisieren, um gegen diese eine verstärkte humorale Immunantwort zu ermöglichen. Weiterhin wurde die Expression des in Escherichia coli - Bakterien klonierten VP_{Thr} serologisch untersucht.

Durch Spaltung des VP_{Thr} mit Bromcyan wurden 4 immunologisch unterscheidbare Peptide erhalten, die zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt wurden. Dabei konnten gegen die Bromcyanpeptide CB_1, CB_2 und CB_3 im indirekten ELISA virusspezifische Antikörper nachgewiesen werden, nicht gegen CB_4, das kleinste der Peptide. Nur CB_1 und CB_2 waren jedoch auch in der Lage, virusneutralisierende Antikörper zu induzieren.

Die Spaltung des nativen Viruspartikels in situ mit den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin, Thermolysin, der Endoproteinase Lys-C und der Arginin-spezifischen Protease aus der Submaxillarisdrüse der Maus führte zu jeweils 2 elektrophoretisch nachweisbaren Spaltpeptiden unterschiedlicher Größe der Strukturuntereinheit VP_{Thr}. Der V8-Protease aus Staphylococcus aureus wurde keine exponierte Schnittstelle auf der Virionoberfläche zur Verfügung gestellt; sie konnte deshalb das Virus nicht spalten.

Der Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin reduzierte die Infektiösität des MKSV, ein Ergebnis, das mit Befunden anderer Autoren übereinstimmt. Die übrigen Enzyme beeinträchtigten die Infektiösität des Virus nicht.

Die größten enzymatischen Bruchstücke wurden nach der Arginin-spezifischen Verdauung erhalten. Von den tryptischen Spaltstücken (T1, T2) und den Fragmenten aus der Arginin-spezifischen Verdauung (A1, A2) konnte nur das A2 noch neutralisierende Antikörper induzieren, obgleich antivirale IgG-Antikörper auch gegen T1 und A1 nachweisbar waren.

Die Bestimmung der Molekulargewichte und der terminalen Aminosäuren der Spaltpeptide, sowie der Vergleich der Brom-

cyanpeptide des VP_{Thr} mit den Bromcyanpeptiden der beiden tryptischen Spaltstücke T1 und T2 des VP_{Thr}, ermöglichte die Lokalisierung der Epitope des VP_{Thr}, die virusneutralisierende Antikörper induzieren können. Diese liegen im letzten, zum C-Ende gerichteten Drittel des VP_{Thr}. Die Aminosäuresequenzen, die bei der tryptischen Verdauung des Virions verloren gingen, müssen als Ursache für die reduzierte Infektiösität des Virus betrachtet werden. Diese Sequenzen liegen in den immunkompetenten Bromcyanpeptiden CB_1 und CB_2, und werden von den beiden tryptischen Spaltstücken T1 und T2 begrenzt, die keine neutralisierenden Antikörper mehr induzieren konnten.

Versuche, die humorale Immunantwort gegen die Bromcyanpeptide des VP_{Thr} in einfachen Peptid-Carrier-Komplexen zu verstärken, scheiterten, obgleich die Kupplungsfähigkeit der Peptide nachgewiesen werden konnte. Auch wurde die immunologische Aktivität der isoliert verabreichten Peptide nicht erreicht. Daher mußte angenommen werden, daß bei der Kupplung dieser großen Bromcyanpeptide native, virushomologe Determinanten maskiert und denaturiert wurden.
Die Immunisierung mit Gemischen aus VP_{Thr}-Bromcyanpeptiden und Erythrozytenmembranfragmenten erbrachte nicht den erhofften Adjuvanseffekt der Membranfragmente. Diese schwächten im Gegenteil die Antikörperantwort gegen die Bromcyanpeptide.

Gentechnologisch synthetisierte MKSV-Genprodukte, insbesondere das VP_{Thr}, konnten mit verschiedenen ELISA-Varianten in Lysaten von Escherichia coli-Plasmid-Rekombinanten nachgewiesen werden. Auf Grund der guten Praktikabilität wurden bevorzugt der direkte ELISA und der indirekte ELISA-Hemmtest eingesetzt. Aus den Inhibitionswerten positiver Lysate konnte die Anzahl exprimierten Moleküle des VP_{Thr}-Fusionsproteins zu ca. 10^4/Bakterienzelle abgeschätzt werden.

In Immunisierungsversuchen mit positiven, ungereinigten Lysaten konnte keine Bildung antiviraler Antikörper nachgewiesen werden. Aus Rekonstitutionsexperimenten mit Gemischen des VP_{Thr} und parentalen Escherichia coli - Lysat ließ sich zeigen, daß der Gehalt des VP_{Thr}-Fusionsproteins in den positiven Lysaten an der Erfassungsgrenze des VP_{Thr} lag. Dagegen gelang es mit teilweise gereinigten VP_{Thr}-Fusionsprotein, neutralisierende Antikörper und eine Immunität in MKSV empfänglichen Tieren hervorzurufen.

G. Literaturverzeichnis

Abu Elzein, E.M.E. & J.R. Crowther (1978): Enzyme-labelled immunosorbent assay techniques in foot-and-mouth disease virus research.
J. Hyg., Camb., 80, 391-399

Abu Elzein, E.M.E. & J.R. Crowther (1979): The specific detection of foot-and-mouth disease virus whole particle antigen (140 S) by enzyme labelled immunosorbent assay.
J. Hyg., Camb., 83, 127-134

Adam, K.-H. & K. Strohmaier (1974): Isolation of the coat proteins of foot-and-mouth disease virus and analysis of the composition and N-terminal endgroups.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 185-192

Adam, K.-H., O.R. Kaaden & K. Strohmaier (1978): Isolation of immunizing cyanogen bromide-peptides of foot-and-mouth disease virus.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 84, 677-683

Adorini, L., A. Miller & E.E. Sercarz (1979a): The fine specificity of regulatory T cells. I. Hen egg-white lysozyme-induced suppressor T cells in a genetically non-responder mouse strain do not recognize a closely related immunogenic lysozyme.
J. Immunol., 122, 871-877

Adorini, L., M.A. Harvey, A. Miller & E.E. Sercarz (1979b): Fine specificity of regulatory T cells. II. Suppressor and helper T cells are induced by different regions of hen egg-white lysozyme in a genetically nonresponder mouse strain.
J. Exp. Med., 150, 293-306

Anderer, F.A. (1963): Preparation and properties of an artificial antigen immunologically related to tobacco mosaic virus.
Biochim. Biophys. Acta, 71, 246-248

Anderer, F.A. & H.-D. Schlumberger (1965): Kreuzreaktion von Antiseren gegen heterologe terminale Aminosäuresequenzen und zwei Stämmen des Tabakmosaikvirus.
Z. Naturforschg., 20b, 564-568

Arnon, R., M. Sela, M. Parant & L. Chedid (1980): Antiviral response elicited by a completely synthetic antigen with built-in adjuvanticity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6769-6772

Avrameas, S. (1969): Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde.
Immunochemistry, 6, 43-52

Bachrach, H.L., J.B. Swaney & G.F. Vande Woude (1973): Isolation of the structural polypeptides of foot-and-mouth disease virus and analysis of their C-terminal sequences.
Virology, 52, 520-528

Bachrach, H.L., D.M. Moore, P.D. McKercher & J. Polatnick (1975): Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus.
J. Immunol., 115, 1636-1641

Bachrach, H.L., D.M. Moore, P.D. McKercher & J. Polatnick (1977): An experimental subunit vaccine for foot-and-mouth disease.
Develop. biol. Standard., 35, 155-160 (S. Karger, Basel)

Bachrach, H.L., D.M. Moore, P.D. McKercher & J. Polatnick (1978): An experimental protein vaccine for foot-and-mouth disease.
Perspectives in Virology, 10, edited by M. Pollard, Raven Press, New York, 147-159

Bachrach, H.L., D.O. Morgan & D.M. Moore (1979): Foot-and-mouth disease virus immunogenic capsid protein VP_T: N-Terminal sequences and immunogenic peptides obtained by CNBr and tryptic cleavages.
Intervirology, 12, 65-72

Bailey, J.L. (1967): Selective cleavage of peptide chains.
Techniques in Protein Chemistry, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 134-162

Barteling, S.J., R.H. Meloen, F. Wagenaar & A.L.J. Gielkens (1979): Isolation and characterization of trypsin-resistant O_1 variants of foot-and-mouth disease virus.
J. gen. Virol., 43, 383-393

Bauminger, S. & M. Wilchek (1980): The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates.
In: Methods in Enzymology, 70A, 151-159, edited by H. Van Vunakis & J.J. Langone, Academic Press, New York-London

Beneke, T.W., K.-O. Habermehl, W. Diefenthal & M. Buchholz (1977): Iodination of poliovirus capsid proteins.
J. gen. Virol., 34, 387-390

Benjamini, E., D. Michaeli & J.D. Young (1972): Antigenic determinants of proteins of defined sequences.
In: Current Topics in Microbiology and Immunology, 58, 85-134, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

Biochemica Dienst: Information über Endoproteinase Lys-C, Mai 1981, Nr. 46, Boehringer Mannheim

Böhm, H.O. & D. Panjevic (1970): Zur Klassifizierung eines Maul- und Klauenseuche-Virusstammes, der den englischen Seuchenzug 1967 bestimmte.
Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr., 83, 409-414

Böhm, H.O. & W. Uhlmann (1972): Die Maul- und Klauenseuche (MKS) in der Bundesrepublik Deutschland von 1960 bis 1969 aus der Sicht der Typendiagnose unter Berücksichtigung des Seuchenzuges 1965/66.
Vet.-Med. Nachr., 2, 122-134

Bonin, O. (1973): Quantitativ-virologische Methodik.
Thieme Verlag, Stuttgart

Brooksby, J.B. (1968): Variants and immunity: definitions for serological investigations.
International symposium on foot-and-mouth disease. Variants and immunity. Lyon, 1967. Symposium series immunobiological standardization, 8, 1-10

Brooksby, J.B. (1981): Genetic engineering and foot-and-mouth disease vaccines.
Nature, 289, 535

Broome, S. & W. Gilbert (1978): Immunological screening method to detect specific translation products.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2746-2749

Brown, F., B. Cartwright & D.L. Stewart (1963a): The effect of varios inactivating agents on the viral and the ribonucleic acid infectivities of foot-and-mouth disease virus and on its attachment to susceptible cells.
J. gen. Microbiol., 31, 179-186

Brown, F., N.St G. Hylskop, J. Crick & A.W. Morrow (1963b): The use of acetylethyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines.
J. Hyg., Camb., 61, 337-344

Brown, F. & C.J. Smale (1970): Demonstration of three specific sites on the surface of foot-and-mouth disease virus by antibody complexing.
J. gen. Virol., 7, 115-127

Burroughs,J.N., D.J. Rowlands, D.V. Sangar, P. Talbot & F. Brown (1971): Further evidence for multiple proteins in the foot-and-mouth disease virus particle.
J. gen. Virol., 13, 73-84

Butterworth, B.E. (1977): Proteolytic processing of animal virus proteins.
In: Current Topics in Microbiology and Immunology, 77, 1-41, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

Carthew, P. & S.J. Martin (1974): The iodination of bovine enterovirus particles.
J. gen. Virol., 24, 525-534

Cavanagh, D., D.V. Sangar, D.J. Rowlands & F. Brown (1977): Immunogenic and cell attachment sites of FMDV: Further evidence for their location in a single capsid polypeptide.
J. gen. Virol., 35, 149-158

Charnay, P., M. Gervais, A. Louise, F. Galibert & P. Tiollais (1980): Biosynthesis of hepatitis B virus surface antigen in Escherichia coli.
Nature, 286, 893-895

Claman, H.N. & E.A. Chaperon (1969): Immunological complementation between thymus and marrow cells, - a model for the two-cell theory of immunocompetence.
Transplant. Rev., 1, 92-125

Cooper, P.D. (1961): An improved agar cell-suspension plaque assay for poliovirus: some factors affecting efficiency of plating.
Virology, 13, 153-157

Cooper, P.D., V.I. Agol, H.L. Bachrach, F. Brown, Y. Ghendon, A.J. Gibbs, J.H. Gillespie, K. Lonberg-Holm, B. Mandel, J.L. Melnick, S.B. Mohanty, R.C. Povey, R.R. Rueckert, F.L. Schaffer & D.A.J. Tyrrell (1978): Picornaviridae: Second report.
Intervirology, 10, 165-180

Cowan, K.M., N. Erol & A.P. Whiteland (1978): Effect of trypsin treatment on the antigenic characteristics of plaque variants of type O_1 and type Asia-1 foot-and-mouth disease virus.
J. gen. Virol., 41, 437-442

Crowther, J.R. & E.M.E. Abu Elzein (1979a): Application of the enzyme linked immunosorbent assay to the detection and identification of foot-and-mouth disease virus.
J. Hyg., Camb., 83, 513-519

Crowther, J.R. & E.M.E. Abu Elzein (1979b): Detection and quantification of foot-and-mouth disease virus by enzyme labelled immunosorbent assay techniques.
J. gen. Virol., 42, 597-602

Cunliffe, H.R. (1973): Inactivation of foot-and-mouth disease virus with ethylenimine.
Appl. Microbiol., 26, 747-750

Derynck, R., E. Remaut, E. Saman, P. Stanssens, E. De Clercq, J. Content & W. Fiers (1980): Expression of human fibroblast interferon gene in Escherichia coli.
Nature, 287, 193-197

Drapeau, G.R. (1977): Cleavage at glutamic acid with staphylococcal protease.
In: Methods in Enzymology, 47E, 189-191, edited by C.H.W. Hirs & S.N. Timasheff, Academic Press, New York-San Francisco-London

Dulbecco, R. & M. Vogt (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.
J. Exp. Med., 99, 167-182

Eißner,G., H.O. Böhm & E. Jülich (1967): Eine Maul- und Klauenseuche-Infektion beim Menschen.
Dtsch. med. Wschr., 92, 830-832

Emtage, J.S., W.C.A. Tacon, G.H. Catlin, B. Jenkins, A.G. Porter & N.H. Carey (1980): Influenza antigenic determinants are expressed from haemagglutinin genes cloned in Escherichia coli.
Nature, 283, 171-174

Engvall, E. & P. Perlmann (1972): Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific amtibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.
J. Immunol., 109, 129-135

Erlanger, B.F. (1980): The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey.
In: Methods in Enzymology, 70A, 85-104, edited by H. Van Vunakis & J.J. Langone, Academic Press, New York-London

Felix, A.M. & M.H. Jimenez (1974): Usage of fluorescamine as a spray reagent for thin-layer chromatography.
J. Chromatography, 89, 361-364

Forman, A.J. (1975): The sub-type classification of strains of foot-and-mouth disease virus.
J. Hyg., Camb., 74, 227-232

Fraenkel-Conrat, H. (1957): Degradation of tobacco mosaic virus with acetic acid.
Virology, 4, 1-4

Franze, R., K.-H. Adam & K. Strohmaier (1981): Localization and characterization of two immunogenic regions on the coat protein VP_{Thr} of foot-and-mouth disease virus (FMDV), subtype O_1K, inducing neutralizing antibodies. Med. Microbiol. Immunol., 169, 154

Frenkel, H.S. (1947): La culture du virus de la fièvre aphteuse sur l'épithélium de la langue des bovidés. Bull. Off. intern. Epizoot., 28, 155-162

Goeddel, D.V., D.G. Kleid, F. Bolivar, H.L. Heyneker, D.G. Yanusara, R. Crea, T. Hirose, A. Kraszewski, K. Itakura & A.D. Riggs (1979): Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 106-110

Goeddel, D.V., E. Yelverton, A. Ullrich, H.L. Heyneker, G. Miozzari, W. Holmes, P.H. Seeburg, T. Dull, l. May, N. Stepping, R. Crea, S. Maeda, R. McCandliss, A. Sloma, J.M. Tabor, M. Gross, P.C. Familletti & S. Pestka (1980): Human leukocyte interferon produced by E. coli is biologically active.
Nature, 287, 411-415

Goodfriend, T.L., L. Levine & G.D. Fasman (1964): Antibodies to bradykinin and angiotensin: a use of carbodiimides in immunology.
Science, 144, 1344-1346

Gray, W.R. (1972): End-group analysis using dansyl chloride. In: Methods in Enzymology, 25B, 121-138, edited by C.H.W. Hirs & S.N. Timasheff, Academic Press, New York-London

Gross, E. & B. Witkop (1962): Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: The methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease.
J. Biol. Chem., 237, 1856-1860

Hardy, K., S. Stahl & H. Küpper (1981): Production in B. subtilis of hepatitis B core antigen and of major antigen of foot-and-mouth disease virus.
Nature, 293, 481-483

Harris, T.J.R. (1979): The nucleotide sequence at the 5' end of foot-and-mouth disease virus RNA.
Nucleic Acids Research, 7, 1765-1785

Harvey, M.A., L. Adorini, A. Miller & E.E. Sercarz (1979): Lysozyme-induced T-suppressor cells and antibodies have a predominant idiotype.
Nature, 281, 594-596

Hayashi, R. (1977): Carboxypeptidase Y in sequence determination of peptides.
In: Methods in Enzymology, 47E, 84-93, edited by C.H.W. Hirs & S.N. Timasheff, Academic Press, New York-San Francisco-London

Heinrikson, R.L. (1977): Applications of thermolysin in protein structural analysis.
In: Methods in Enzymology, 47E, 175-189, edited by C.H.W. Hirs & S.N. Timasheff, Academic Press, New York-San Francisco-London

Hofschneider, P.H., E. Bürgelt, M. Kauzmann, M. Mussgay, R. Franze, R. Ahl, H. Böhm, K. Strohmaier, H. Küpper & B. Otto (1981): Studies on the antigenicity and immunogenicity of the foot-and-mouth disease viral protein VP1 expressed in E. coli.
In: Prospective Biological Products for Viral Diseases, 6th Munich Symposium on Microbiology, 105-113;
Ed. P.A. Bachmann; Taylor and Francis, London

Hunter, W.M. & F.C. Greenwood (1962): Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.
Nature, 194, 495-496

Hurn, B.A.L. & S.M. Chantler (1980): Production of reagent antibodies.
In: Methods in Enzymology, 70A, 104-142, edited by H. Van Vunakis & J.J. Langone, Academic Press, New York-London

Inman, J.K., B. Merchant, L. Claflin & S.E. Tacey (1973): Coupling of large haptens to proteins and cell surfaces: Preparation of stable, optimally sensitized erythrocytes for hapten-specific, hemolytic plaque assays.
Immunochemistry, 10, 165-174

Itakura, K., T. Hirose, R. Crea, A.D. Riggs, H.L. Heyneker, F. Bolivar & H.W. Boyer (1977): Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin.
Science, 198, 1056-1063

James, G.T. (1980): Peptide mapping of proteins.
In: Methods of Biochemical Analysis, 26, 165-200, edited by D. Glick; J. Wiley & Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto

Jaton, J.-C., D.C. Brandt & P. Vassalli (1979): The isolation and characterization of immunoglobulins, antibodies, and their constituent polypeptide chains.
In: Immunological Methods, 43-67, edited by I. Lefkovits & B. Pernis, Academic Press, New York-San Francisco-London

Kaaden, O.R., K.-H. Adam & K. Strohmaier (1977): Induction of neutralizing antibodies and immunity in vaccinated guinea gigs by cyanogen bromide-peptides of VP_3 of foot-and-mouth disease virus.
J. gen. Virol., 34, 397-400

King, A.M.Q., B.O. Underwood, D. McCahon, J.W.I. Newman & F. Brown (1981): Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot-and-mouth disease in the UK.
Nature, 293, 479-480

Kitamura, N., C.J. Adler, P.G. Rothberg, J. Martinko, S.G. Nathenson & E. Wimmer (1980): The genome-linked protein of picornaviruses. VII. Genetic mapping of poliovirus VP_g by protein and RNA sequence studies.
Cell, 21, 295-302

Küpper, H., W. Keller, C. Kurz, S. Forss, H. Schaller, R. Franze, K. Strohmaier, O. Marquardt, V.G. Zaslavsky & P.H. Hofschneider (1981): Cloning of cDNA of major antigen of foot-and-mouth disease virus and expression in E. coli.
Nature, 289, 555-559

Kurz, C., S. Forss, H. Küpper, K. Strohmaier & H. Schaller (1981): Nucleotide sequence and corresponding amino acid sequence of the gene for the major antigen of foot-and-mouth disease virus.
Nucleic Acid Research, 9, 1919-1931

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 227, 680-685

Landon, M. (1977): Cleavage at aspartyl-prolyl bonds.
In: Methods in Enzymology, 47E, 145-149, edited by C.H.W. Hirs & S.N. Timasheff, Academic Press, New York-San Francisco-London

Laporte, M.J., J. Grosclaude, J. Wantyghem, S. Bernard & P. Rouzé (1973): Neutralisation en culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus de la fièvre aphteuse par des sérums provenant de porcs immunisés à l'aide d'une protéine virale purifiée.
Compte rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences (Paris), serie D 276, 3399-3401

La Torre, J.L., M.J. Grubman, B. Baxt & H.L. Bachrach (1980): The structural polypeptides of aphthovirus are phosphoproteins.
Microbiology, 77, 7444-7447

Lau, C.K. & J.M. Fujitaki (1981): An improved method of microdialysis.
Analyt. Biochem., 110, 144-145

Levy, M., L. Fishman & I. Schenkein (1970): Mouse submaxillary gland proteases.
In: Methods in Enzymology, 19, 672-681, edited by E.E. Perlmann & L. Lorand, Academic Press, New York-London

Likhite, V. & A. Sehon (1967): Protein-protein conjugation.
In: Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. I, 1.E.6, 150-167, edited by C.A. Williams & M.W. Chase, Academic Press, New York-London

Loeffler, F. & P. Frosch (1897): Summarischer Bericht über die Ergebnisse der Untersuchungen der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institute für Infektionskrankheiten in Berlin.
Zbl. Bakt. Abt. I. Orig., 22, 257-259

Lonberg-Holm, K. & B.E. Butterworth (1976): Investigation of the structure of polio- and human rhinovirions through the use of selective chemical reaktivity.
Virology, 71, 207-216

Lübke, K. & B. Nieuweboer (1978): Immunologische Teste für niedermolekulare Wirkstoffe.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Lund, G.A., B.R. Ziola, A. Salmi & D.G. Scraba (1977): Structure of the mengo virion. V. Distribution of the capsid polypeptides with respect to the surface of the virus particle.
Virology, 78, 35-44

Machleidt, W.O.J. & E. Wachter (1977): Chromatography on micropore columns.
In: Methods in Enzymology, 47E, 210-220, edited by C.H.W. Hirs & S.N. Timasheff, Academic Press, New York-San Francisco-London

Maizels, R.M., J.A. Clarke,M.A. Harvey, A. Miller & E.E. Sercarz (1980a): Epitope specificity of the T cell proliferative response to lysozyme: Proliferative T cells react predominantly to different determinants from those recognized by B cells.
Eur. J. Immunol., 10, 509-515

Maizels, R.M., J.A. Clarke, M.A. Harvey, A. Miller & E.E. Sercarz (1980b): Ir-gene control of T cell proliferative responses: Two distinct expressions of the genetically nonresponsive state.
Eur. J. Immunol., 10, 516-520

Matheka, H.D., A. Mayr & K. Bögel (1962): Die Trypsin-Resistenzprüfung zur Differenzierung kleiner, Chloroform-stabiler Virusarten.
Zbl. Bakt. Abt. I. Orig., 187, 137-143

Matheka, H.D. & H.L. Bachrach (1975): N-Terminal amino acid sequences in the major capsid proteins of foot-and-mouth disease virus types A, O and C.
J. Virol., 16, 1248-1253

Matheka, H.D., P.-J. Enzmann, H.L. Bachrach & B. Migl (1977): The influence of sodium dodecyl sulfate from different sources on the separation of virus proteins in polyacrylamide gel electrophoresis.
Analyt. Biochem., 81, 9-17

Matsubara, H., R. Sasaki, A. Singer & T.H. Jukes (1966): Specific nature of hydrolysis of insulin and tobacco mosaic virus protein by thermolysin.
Arch. Biochem. Biophys., 115, 324-331

Matthews, R.E.F. (1979): Classification and nomenclature of viruses.
Intervirology, 12, 239-243

Melnick, J.L., V.I. Agol, H.L. Bachrach, F. Brown, P.D. Cooper, W. Fiers, S. Gard, J.H.S. Gear, Y. Ghendon, L. Kasza, M. LaPlaca, B. Mandel, S. McGregor, S.B. Mohanty, G. Plummer, R.R. Rueckert, F.L. Schaffer, I. Tagaya, D.A.J. Tyrrell, M. Voroshilova & H.A. Wenner (1974):Picornaviridae.
Intervirology, 4, 303-316

Meloen, R.H., D.J. Rowlands & F. Brown (1979): Comparison of the antibodies elicited by the individual structural polypeptides of foot-and-mouth disease and polio viruses.
J. gen. Virol., 45, 761-763

Meloen, R.H. & J. Briaire (1980): A study of the cross-reacting antigens on the intact foot-and-mouth disease virus and its 12 S subunits with antisera against the structural proteins.
J. gen. Virol., 51, 107-116

Miller, J.F.A.P., P.M. DeBurgh & G.A. Grant (1965): Thymus and the production of antibody-plaque-forming cells.
Nature, 208, 1332-1334

Miller, J.F.A.P. & G.F. Mitchel (1969): Thymus and antigen-reactive cells.
Transplant. Rev., 1, 3-51

Moore, D.M. & K.M. Cowan (1978): Effect of trypsin and chymotrypsin on the polypeptides of large and small plaque variants of foot-and-mouth disease virus: Relationship to specific antigenicity and infectivity.
J. gen. Virol., 41, 549-562

Nagata, S., H. Taira, A. Hall, L. Johnsrud, M. Streuli, J. Ecsödi, W. Boll, K. Cantell & C. Weissmann (1980): Synthesis in E. coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity.
Nature, 284, 316-320

Nakai, N., C.Y. Lai & B.L. Horecker (1974): Use of fluorescamine in the chromatographic analysis of peptides from proteins.
Analyt. Biochem., 58, 563-570

Pallansch, M.A., O.M. Kew, A.C. Palmenberg, F. Golini, E. Wimmer & R.R. Rueckert (1980): Picornaviral VP_g sequences are contained in the replicase precursor.
J. Virol., 35, 414-419

Pilz, W. & H.G. Garbe (1965): Weitere Fälle von Maul- und Klauenseuche-MKS-Infektionen beim Menschen.
Zbl. Bakt. Abt. I. Orig., 198, 154-157

Piszkiewicz, D., M. Landon & E.L. Smith (1970): Anomalous cleavage of aspartyl-proline peptide bonds during amino acid sequence determinations.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 1173-1178

Pyl, G. (1953): Die Herstellung eines Konzentrat-Adsorbat-Impfstoffes gegen Maul- und Klauenseuche aus gereinigtem Antigen.
Arch. exp. Vet. Med., 7, 238-245

Rajewsky, K., V. Schirrmacher, S. Nase & N.K. Jerne (1969): The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity.
J. Exp. Med., 129, 1131-1143

Reichlin, M. (1980): Use of glutaraldehyd as a coupling agent for proteins and peptides.
In: Methods in Enzymology, 70A, 159-165, edited by H. Van Vunakis & J.J. Langone, Academic Press, New York-London

Rekosh, D.M.K. (1977): The molekular biology of picornaviruses.
In: The molecular biology of animal viruses, Vol. 1, 64-110, edited by D.P. Nayak; M. Dekker, Inc., New York-Basel

Richards, F.M. & J.R. Knowles (1968): Glutaraldehyd as a protein cross-linking reagent.
J. Mol. Biol., 37, 231-233

Rittenberg, M.B. & A.A. Amkraut (1966): Immunogenicity of trinitrophenyl-hemocyanin: Production of primary and secondary anti-hapten precipitins.
J. Immunol., 97, 421-430

Röhrer, H. & A.-F. Olechnowitz (1980): Maul- und Klauenseuche.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Rosenberger, G. (1970): Maul- und Klauenseuche.
In: Krankheiten des Rindes, 835-843; Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg

Rowlands, D.J., D.V. Sangar & F. Brown (1971): Relationship of the antigenic structure of foot-and-mouth disease virus to the process of infection.
J. gen. Virol., 13, 85-93

Rweyemamu, M.M., J.C. Booth, M. Head & T.W.F. Pay (1978): Microneutralization tests for serological typing and subtyping of foot-and-mouth disease virus strains.
J. Hyg., Camb., 81, 107-123

Sangar, D.V. (1979): The replication of picornaviruses.
J. gen. Virol., 45, 1-13

Schäfer, W. (1979): Der Mäuse-Inzuchtstamm STU. Entwicklung und Eigenschaften.
Z. Naturforschg., 34c, 306-309

Schmid-Jensen, H.O., S. Schmidt & A. Hansen (1936): Immunisation active du cobaye contre la fièvre aphteuse au moyen du virus non attenué combiné avec l'hydroxyde d'aluminium.
Rev. Immunol., 2, 359

Schroeder, W.A., J.B. Shelton & J.R. Shelton (1969): An examination of conditions for the cleavage of polypeptide chains with cyanogen bromide: Application to catalase.
Arch. Biochem. Biophys., 130, 551-556

Schultz, J. (1967): Cleavage at aspartic acid.
In: Methods in Enzymology, 11, 255-263, edited by C.H.W. Hirs, Academic Press, New York-London

Scraba, D.C. (1979): The picornavirion: Structure and assembly.
In: The molecular biology of picornaviruses, 1-23, edited by R. Pérez-Bercoff, Plenum Press, New York-London

Sercarz, E.E., R.L. Yowell, D. Turkin, A. Miller, B.A. Araneo & L. Adorini (1978): Different functional specificity repertoires for suppressor and helper T cells. Immunol. Rev., 39, 108-136

Stoker, M. & I. McPherson (1964): Syrian hamster fibroblast cell line BHK-21 and its derivates. Nature, 203, 1355-1357

Strobbe, R., G. Charlier, A. van Aert, J. Debecq & J. Leunen (1974): Polyacrylamide gel electrophoresis and immunogenicity of foot-and-mouth disease virus. Arch. exp. Vet. Med., 28, 401-407

Strohmaier, K. & K.-H. Adam (1974): Comparative electrophoretic studies of foot-and-mouth disease virus proteins. J. gen. Virol., 22, 105-114

Strohmaier, K. & K.-H. Adam (1975): New results concerning the coat proteins of foot-and-mouth disease virus. Bull. Off. intern. Epizoot., 83, 425-429

Strohmaier, K. & K.-H. Adam (1976): Die Struktur des Virus der Maul- und Klauenseuche. Zbl. Vet. Med. B., 23, 483-506

Strohmaier, K., O.R. Kaaden, K.-H. Adam & B. Wittmann-Liebold (1978a): Estimation of 140 S particles by physical techniques, isolation of immunizing peptides and determination of some sequences of the coat proteins of foot-and-mouth disease virus. Report of the session of the research group of the standing technical committee of the european commission for the control of foot-and-mouth disease, 55-66

Strohmaier, K., B. Wittmann-Liebold & A.-W. Geissler (1978b): The N-terminal sequence of three coat proteins of foot-and-mouth disease virus.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 1640-1645

Strohmaier, K., R. Franze & K.-H. Adam (1980): Application of the enzyme labelled immunosorbent assay (ELISA) for the study of the structure of foot-and-mouth disease virus. Report of the session of the research group of the standing technical committee of the european commission for the control of foot-and-mouth disease, 80-86

Strohmaier, K., R. Franze & K.-H. Adam (1982): Localization and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein.
J. gen. Virol., in Druck

Subak-Sharpe, H. (1961a): The quantitative study of foot-and-mouth disease virus in unweaned mice. I. Studies of various factors affecting quantitative analysis.
Arch. ges. Virusforsch., 11, 1-38

Subak-Sharpe, H. (1961b): The quantitative study of foot-and-mouth disease virus in unweaned mice. II. Studies with additional mouse strains and comparison of some methods of titration.
Arch. ges. Virusforsch., 11, 39-63

Subak-Sharpe, H. (1961c): The effect of passage history, route of inoculation, virus strain and host strain on the susceptibility of adult mice to the virus of foot-and-mouth disease.
Arch. ges. Virusforsch., 11, 373-399

Subak-Sharpe, H., C.R. Pringle & S.E. Hollom (1963): Factors influencing the dynamics of the multiplication of foot-and-mouth disease virus in adult mice. Arch. ges. Virusforsch., 12, 600-619

Sugimura, T. & G. Eißner (1976): Typing of foot-and-mouth disease virus by fluorescent antibody technique. Nat. Inst. Anim. Hlth Quart., 16, 152-159

Swank, R.T. & K.D. Munkres (1971): Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. Analyt. Biochem., 39, 462-477

Tager, H.S. (1976): Coupling of peptides to albumin with difluorodinitrobenzene. Analyt. Biochem., 71, 367-375

Uhlmann, W. (1958): Beobachtungen über die Empfänglichkeit erwachsener weißer Mäuse für die intraperitoneale Infektion mit dem Virus der Maul- und Klauenseuche. Mh. Tierhk., 10, 234-241

Uhlmann, W. (1960): Untersuchungen über die Virämie bei erwachsenen Mäusen nach der intraperitonealen Injektion von Maul- und Klauenseuche-Virus verschiedener Herkunft. Mh. Tierhk., 12, 79-92

Vallée, H., H. Carré & P. Rinjard (1926): Sur l'immunisation antiaphteuse par le virus formole. J. Med. Vet., 72, 367

Vande Woude, G.F., J.B. Swaney & H.L. Bachrach (1972): Chemical and physical properties of foot-and-mouth disease virus: A comparison with Maus Elberfeld virus. Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 1222-1229

Vetterlein, W. (1954): Das klinische Bild der Maul- und Klauenseuche beim Menschen, aufgestellt aus den bisher experimentell gesicherten Erkrankungen.
Arch. exp. Vet. Med., 8, 541-564

Voller, A. & D.E. Bidwell (1975): A simple method for detecting antibodies to rubella.
Br. J. exp. Path., 56, 338-339

Voller, A., D.E. Bidwell & A. Barlett (1976): Enzyme immunoassays in diagnostic medicine.
Bull. World Health Organ., 53, 55-65

Wagner, G.G., J.L. Card & K.M. Cowan (1970): Immunochemical studies of foot-and-mouth disease.
VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylene glycol precipitation.
Arch. ges. Virusforsch., 30, 343-352

Waldmann, O. & K. Köbe (1938): Die aktive Immunisierung des Rindes gegen Maul- und Klauenseuche.
Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr., 54, 317

Wetz, K. & K.-O. Habermehl (1979): Topographical studies on poliovirus capsid proteins by chemical modification and cross-linking with bifunctional reagents.
J. gen. Virol., 44, 525-534

Wild, T.F. & F. Brown (1967): Nature of inactivating action of trypsin on foot-and-mouth disease virus.
J. gen. Virol., 1, 247-250

Wild, T.F., J.N. Burroughs & F. Brown (1969): Surface structure of foot-and-mouth disease virus.
J. gen. Virol., 4, 313-320

Wittmann, G. & A. Mayr (1966): Versuche zur Entwicklung einer Lebendvakzine gegen die Maul- und Klauenseuche des Schweines.
Zbl. Vet. Med. B, 13, 539-557

Wittmann, G. (1972): Immunität und Immunisierung gegen Maul- und Klauenseuche (MKS) - Virus.
Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr., 85, 281-284

Wold, F. (1972): Bifunctional reagents.
In: Methods in Enzymology, 25B, 623-651, edited by C.H.W. Hirs & S.N. Timasheff, Academic Press, New York-London

Yalow, R.S. & S.A. Berson (1959): Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.
Nature, 184, 1648-1649

Lebenslauf

Am 1. August 1949 wurde ich, Reinhard W. Franze, als erstes Kind des Schreinermeisters Otto Franze und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Rolke, in Dickersbronn Krs. Dinkelsbühl/Mfr. geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Stuttgart-Sommerrain von 1956 - 1960 wechselte ich auf das Johannes-Kepler-Gymnasium in Stuttgart-Bad Cannstatt über, an dem ich 1968 die Reifeprüfung ablegte. Von Juli 1968 bis Januar 1970 leistete ich meinen Wehr- und Zivildienst in Mannheim bzw. Heidelberg ab.
Im Sommersemester 1970 begann ich mit dem Studium der Chemie, im Wintersemester 1973/74 mit dem Studium der Biologie an der Ruprecht-Karl-Universität in Heidelberg. Am 30 Mai 1974 legte ich die Vordiplomprüfungen in Chemie und am 15. Juli 1974 in Biologie ab. Das Studium der Biologie schloß ich am 9. August 1978 mit dem Diplom ab.
In der Zeit Mai 1977 bis Juni 1978 fertigte ich am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg meine Diplomarbeit "Die Regulation von zellvermittelten Immunreaktionen: Charakterisierung einer Cyclophosphamid-sensitiven Suppressor-T-Zelle" an.
Von Oktober 1978 bis Juli 1981 war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen angestellt. In dieser Zeit fertigte ich meine Dissertation "Charakterisierung immunologisch wirksamer Proteine und Peptide des Maul- und Klauenseuche-Virus" am Institut für Mikrobiologie der BFA unter Anleitung von Herrn Dr. K. Strohmaier an.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten Schäfer, Schramm, Plieninger, Hofmann, Jander, Sundermeyer, Siebert, Schildknecht, Staab, v. Sengbusch, Hofmann-Berling, Fuchs, Bujard, Bautz, Melchers, Braun, Dröge, Willer, Duspiva, Zwilling, Klein, Senghas, Egger.